

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC A TROIS-RIVIÈRES

MÉMOIRE PRÉSENTÉ A
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC A TROIS-RIVIÈRES

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAITRISE EN BIOPHYSIQUE

PAR
LUCIE LORRAIN

ÉTUDE EN SPECTROSCOPIE D'ABSORPTION, D'ÉMISSION ET
PHOTOACOUSTIQUE DE CHLOROPLASTES ET DE THYLACOÏDES
INCORPORÉS DANS DES FILMS D'ALCOOL DE POLYVINYLE

FÉVRIER 1987

Université du Québec à Trois-Rivières

Service de la bibliothèque

Avertissement

L'auteur de ce mémoire ou de cette thèse a autorisé l'Université du Québec à Trois-Rivières à diffuser, à des fins non lucratives, une copie de son mémoire ou de sa thèse.

Cette diffusion n'entraîne pas une renonciation de la part de l'auteur à ses droits de propriété intellectuelle, incluant le droit d'auteur, sur ce mémoire ou cette thèse. Notamment, la reproduction ou la publication de la totalité ou d'une partie importante de ce mémoire ou de cette thèse requiert son autorisation.

RÉSUMÉ

Les plantes vertes peuvent, à partir de gaz carbonique, d'eau et d'énergie lumineuse, former des sucres et de l'oxygène par le mécanisme de la photosynthèse. Les étapes primaires de la photosynthèse se produisent au niveau des chloroplastes des feuilles, et plus spécifiquement au niveau de la membrane des thylacoïdes. Il existe dans cette membrane deux types de transfert d'énergie, en l'occurrence le transfert d'énergie électromagnétique et le transport d'électron sous forme de réactions rédox. C'est le transfert d'énergie électromagnétique que nous voulons mieux comprendre au cours de ce travail, et pour ce faire, nous étudions l'effet de l'orientation des pigments photosynthétiques. Des spectres d'absorption, d'émission et de photoacoustique de chloroplastes et de thylacoïdes sont pris en lumière naturelle et en lumière polarisée. Afin d'orienter nos systèmes photosynthétiques, nous incorporons les chloroplastes et les thylacoïdes dans des films d'alcool de polyvinyle. Il est possible d'étirer le film pour le rendre anisotrope. Ces films ont l'avantage de stabiliser les échantillons ce qui permet l'utilisation du même échantillon pour les différentes mesures spectroscopiques. Ainsi, à l'aide de mesure de dichroïsme linéaire, nous observons une anisotropie d'absorption des chloroplastes et des thylacoïdes incorporés dans un film d'alcool de polyvinyle étiré. Cependant, cette anisotropie est inexistante dans le cas du film non-étiré. L'examen de photographies d'échantillons prisent avec un microscope à fluorescence, montre

que les chloroplastes et les thylacoïdes incorporés dans des films étirés subissent une déformation dans le sens de l'élongation des films. A partir de nos résultats, nous calculons le facteur d'anisotropie optique et l'indice de déformation mécanique afin d'établir les mécanismes responsables du dichroïsme linéaire. Les spectres d'émission polarisée des chloroplastes et des thylacoïdes montrent que durant l'élongation du film, il y a une perturbation du processus de transfert d'énergie d'excitation qui serait due à une réorientation partielle des molécules lors de la déformation des chloroplastes et des thylacoïdes. En se basant sur les spectres d'absorption et de photoacoustique, nous calculons la désactivation thermique des pigments photosynthétiques. Nos résultats montrent que lorsque les pigments tels que la chlorophylle-b et les caroténoïdes ont une faible intensité de fluorescence la valeur de leur désactivation thermique est supérieure à celle des pigments ayant un rendement quantique élevé de fluorescence. Ainsi, le présent travail caractérise les phénomènes spectroscopiques propres à l'orientation des pigments ce qui permet d'apporter une contribution à la compréhension du transfert d'énergie électromagnétique parmi les chromophores des fragments photosynthétiques.

REMERCIEMENTS

Je tiendrais en tout premier lieu à remercier mon directeur de thèse, monsieur Roger M. Leblanc, pour son appui constant et sa grande collaboration pour la rédaction de cette thèse. Le Docteur Leblanc a fait preuve d'une patience remarquable et je lui en suis reconnaissante.

Aussi je m'en voudrais de ne pas mentionner l'apport précieux du professeur Danuta Frackowiak au cours de cette recherche.

De plus pour tous ceux et celles qui de près ou de loin ont contribué à l'achèvement de ce travail un merci bien sincère.

Enfin, permettez-moi de souligner le remarquable travail de dactylographie effectué par mesdames Denise Pronovost et Denise Toupin.

TABLE DES MATIÈRES

	Page
RÉSUMÉ.....	ii
REMERCIEMENTS.....	iv
TABLE DES MATIÈRES.....	v
LISTE DES TABLEAUX.....	viii
LISTE DES FIGURES.....	x
CHAPITRES	
I. INTRODUCTION.....	1
A) Généralités sur la photosynthèse.....	1
B) Spectroscopie d'absorption.....	6
C) Spectroscopie en lumière polarisée.....	11
D) But du travail.....	13
II. THÉORIE.....	14
A) Relation entre la déformation mécanique et l'anisotropie optique des échantillons.....	14
B) Dichroïsme linéaire.....	16
C) Spectroscopie photoacoustique.....	18
D) Calcul de la désactivation thermique à partir de composantes gaussiennes des spectres d'absorption et de photoacoustique.....	25

III. MATÉRIEL ET MÉTHODE.....	28
A) Extraction et purification des chloroplastes et des thylacoïdes.....	28
B) Préparation des milieux isotrope et anisotrope.....	30
C) Photographies.....	33
D) Spectroscopie en lumière polarisée.....	33
a) Absorption.....	33
b) Émission.....	34
c) Photoacoustique.....	36
E) Mesure de la durée de vie de fluorescence.....	38
a) Comptage de photon.....	38
b) Modulation de phase.....	39
IV. RÉSULTATS ET DISCUSSION.....	42
A) Photographies des échantillons.....	42
B) Relation entre la déformation mécanique et l'anisotropie optique des échantillons.....	45
C) Propriétés spectroscopiques en lumière polarisée.....	50
a) Absorption.....	50
b) Excitation.....	59
c) Émission.....	68
d) Photoacoustique.....	80
D) Calculs de la désactivation thermique à partir de composantes gaussiennes des spectres d'absorption et de photoacoustique.....	86

E) Durée de vie de fluorescence.....	94
V. CONCLUSION.....	101
RÉFÉRENCES.....	104

LISTE DES TABLEAUX

	Page
1. Maximum et largeur à mi-hauteur des composantes gaussiennes.....	27
2. Valeurs de l'anisotropie optique (Δ), de la déformation mécanique (D) et leur rapport (Δ/D) pour les chloro- plastés, les thylacoïdes et le Rouge de Congo incorporés dans des films d'alcool de polyvinyle.....	46
3. Valeurs du dichroïsme linéaire (DL) pour les chloro- plastés et les thylacoïdes.....	56
4. Valeurs de l'intensité relative des spectres d'excitation de fluorescence pour différents maximums.....	67
5. Intensité de fluorescence des chloroplastes et des thylacoïdes de la préparation 1 à différents maximums.....	69
6. Valeurs du rapport de l'intensité d'émission (F_{HH}/F_{VH}) à différents maximums pour les chloroplastes et les thylacoïdes de la préparation 1.....	79

7. Rapport entre le signal photoacoustique et le coefficient d'absorption à certaines longueurs d'onde pour les échantillons de la préparation 1, en lumière naturelle (n), polarisée parallèlement (||) ou perpendiculairement (\perp)..... 87
8. Valeurs de la désactivation thermique (DT) polarisée de certaines composantes gaussiennes situées dans la région spectrale de 640-693 nm, pour les échantillons de la préparation 1, dans les films non-étiré (0%) et étiré (300%)..... 91
9. Valeurs de la durée de vie moyenne prise à l'aide de la méthode de fluorescence par modulation de phase, et calculée à partir des résultats obtenus à l'aide du fluorimètre PRA (*)..... 98

LISTE DES FIGURES

	Page
1. Schéma représentant les principales réactions de la photosynthèse.....	2
2. Schémas représentant une coupe transversale d'une feuille (a), d'un chloroplaste (b) et d'un thylacoïde (c)..	3
3. Schémas représentant la membrane photosynthétique (a) et le potentiel rédox des réactions photosynthétiques (b)..	5
4. Comparaison entre les spectres d'absorption des chlorophylles- <u>a</u> et <u>b</u> , des caroténoïdes et le spectre d'action de la photosynthèse.....	7
5. Structure moléculaire de la chlorophylle- <u>a</u>	9
6. Diagramme des niveaux énergétiques de la chlorophylle- <u>a</u> (A) et leur position sur le spectre d'absorption (B).....	10
7. Schéma d'une cellule photoacoustique (a) ainsi que la représentation d'une coupe longitudinale de la cellule (b).....	19

8. Distribution spatiale de la température en fonction du temps dans la couche de gaz adjacente au solide.....	24
9. Schémas du support servant à étirer les films d'alcool de polyvinyle en position initiale (a) et finale (b).....	32
10. Représentation schématique des mesures d'excitation et d'émission de fluorescence.....	35
11. Schéma du spectrophotomètre photoacoustique.....	37
12. Schéma de l'appareil servant à mesurer la durée de vie de fluorescence par modulation de phase.....	40
13. Photographies de chloroplastes incorporés dans des films d'alcool de polyvinyle non-étiré (0%) (A) et étiré (300%) (B).....	43
14. Photographie de thylacoïdes incorporés dans un film étiré d'alcool de polyvinyle (300%).....	44
15. Schémas du film de Rouge de Congo avant (a) et après (b) étirement.....	48

16.	Spectres d'absorption de chloroplastes de la préparation 1 dans un film non-étiré pris en lumière naturelle (n), polarisée parallèlement () ou perpendiculairement (⊥) à l'échantillon.....	52
17.	Spectres d'absorption de chloroplastes (A) et de thylacoïdes (B) dans des films isotropes (0%), pour les échantillons des préparations 1 et 2.....	53
18.	Spectres d'absorption de chloroplastes (A) et de thylacoïdes (B) de la préparation 1, dans des films anisotropes (300%), en lumière polarisée parallèlement () ou perpendiculairement (⊥) à l'échantillon.....	55
19.	Spectres d'excitation de fluorescence de chloroplastes 0% (—) et 300% (---) et de thylacoïdes 0% (.....) et 300% (·-·-·) incorporés dans des films d'alcool de polyvinyle ($\lambda_{\text{émis}} = 674 \text{ nm}$).....	60
20.	Spectres d'excitation de fluorescence de thylacoïdes 0% (.....) et 300% (·-·-·) incorporés dans des films d'alcool de polyvinyle ($\lambda_{\text{émis}} = 700 \text{ nm}$).....	62
21.	Spectres d'excitation de fluorescence de chloroplastes 0% (—) et 300% (---) et de thylacoïdes 0% (.....) et 300% (·-·-·) incorporés dans des films d'alcool de polyvinyle ($\lambda_{\text{émis}} = 730 \text{ nm}$).....	64

22.	Spectres d'excitation de fluorescence de chloroplastes 0% (—) et 300% (---) et de thylacoïdes 0% (.....) et 300% (·-·-·) incorporés dans des films d'alcool de polyvinyle ($\lambda_{\text{émis}} = 750 \text{ nm}$).....	65
23.	Spectres de fluorescence de thylacoïdes des préparations 1 (—) et 2 (---).....	72
24.	Spectres de fluorescence de chloroplastes (A) et de thylacoïdes (B) de la préparation 1 dans des films isotropes ($\lambda_{\text{exc}} = 420 \text{ nm}$).....	74
25.	Spectres de fluorescence de chloroplastes (A) et de thylacoïdes (B) de la préparation 1 dans des films anisotropes ($\lambda_{\text{exc}} = 420 \text{ nm}$).....	76
26.	Spectres photoacoustiques de chloroplastes incorporés dans un film isotrope (A) ou anisotrope (B) pris en lumière naturelle (n), polarisée parallèlement () ou perpendiculairement (\perp) à l'échantillon.....	81
27.	Spectres photoacoustiques de thylacoïdes incorporés dans un film isotrope (A) ou anisotrope (B) pris en lumière naturelle (n), polarisée parallèlement () ou perpendiculairement (\perp) à l'échantillon.....	82

28. Spectres d'absorption (.....) (A) et de photoacoustique
(.....) (B) de thylacoïdes en lumière polarisée
parallèlement, ainsi que les composantes gaussiennes
(—) des deux bandes principales et leur résultante
(---)..... 90
29. Courbe de déclin de fluorescence (1) de chloroplastes
en milieu isotrope (A) et de thylacoïdes en milieu
anisotrope (B)..... 96

CHAPITRE I

INTRODUCTION

A) Généralités sur la photosynthèse

La photosynthèse joue un rôle important dans l'évolution de la planète car grâce à ce mécanisme, les plantes vertes et les algues produisent de l'oxygène et des hydrates de carbone à partir de gaz carbonique, d'eau et de lumière. A la figure 1, nous présentons un schéma réactionnel des deux phases de la photosynthèse, soit les phases lumineuse et obscure. Après l'absorption de la lumière par les plantes, il se produit durant la phase lumineuse de la photosynthèse un ensemble de réactions d'oxydo-réduction menant à la formation de l'oxygène, du NADPH et de l'ATP. L'oxygène est pour sa part dégagé dans l'atmosphère, alors que le NADPH et l'ATP sont nécessaire à la synthèse des hydrates de carbone.

Les plantes et les algues se situent au bas de la lignée évolutive. Nous pourrions penser, que par le fait même, ce sont des organismes très simples, mais ce n'est pas le cas. Prenons l'exemple d'une feuille, en examinant une coupe transversale (fig. 2a), nous nous rendons compte qu'il existe un grand degré d'organisation. A l'intérieur des cellules végétales, nous retrouvons un organelle, le chloroplaste (Fig. 2b). Et

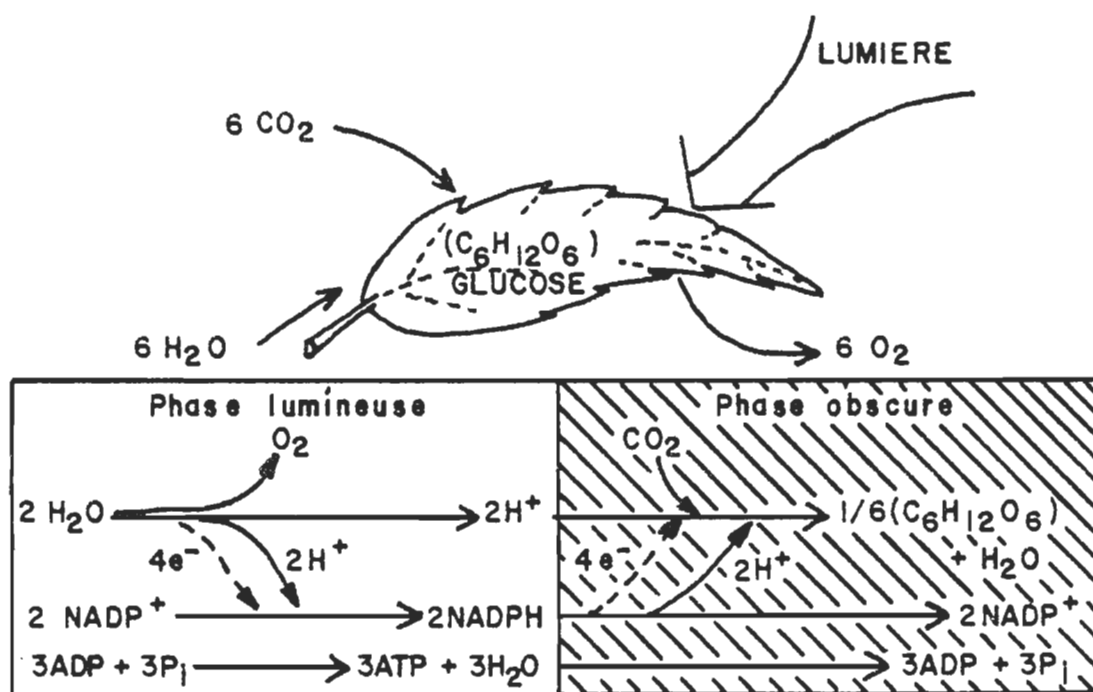


Figure 1. Schéma représentant les principales réactions de la photosynthèse.

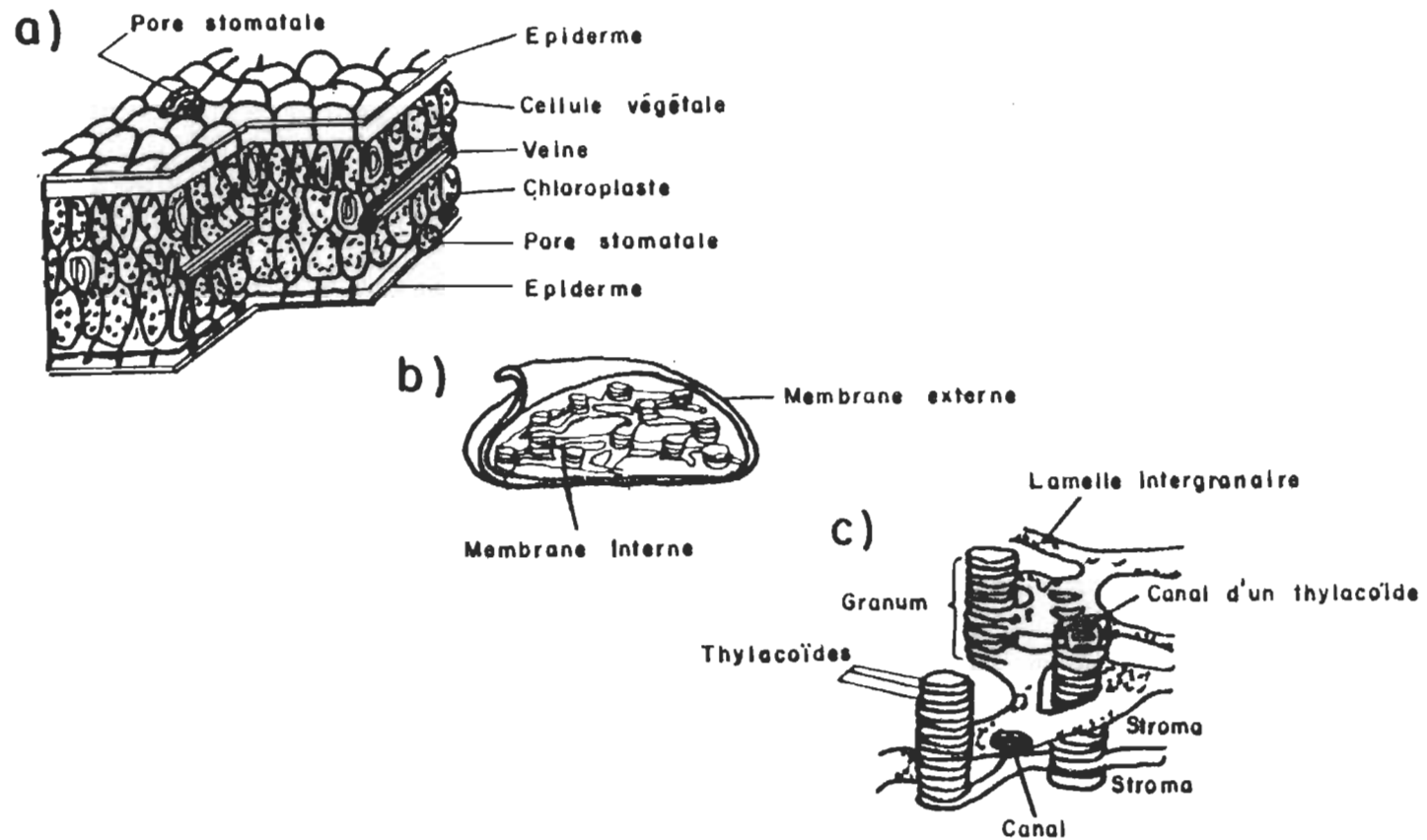


Figure 2. Schémas représentant une coupe transversale d'une feuille (a), d'un chloroplaste (b) et d'un thylacoïde (c).

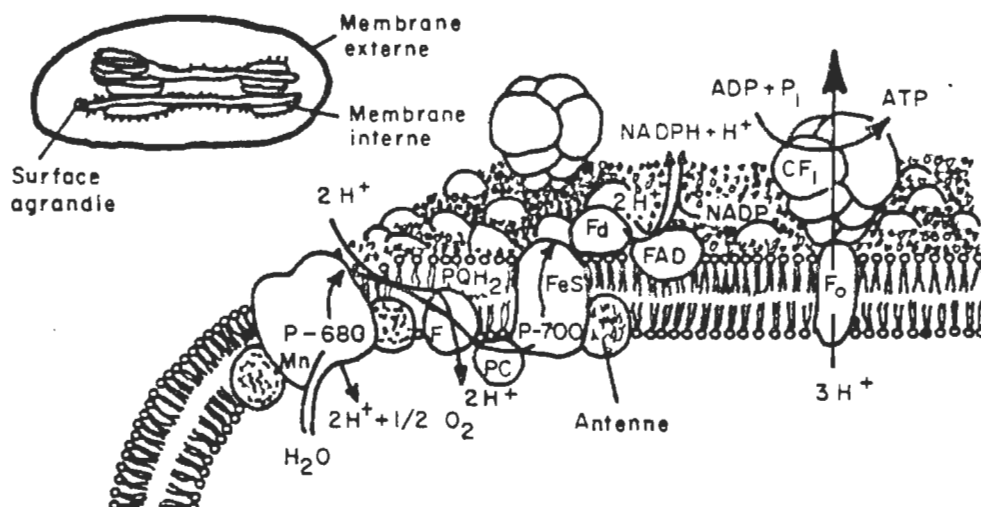
c'est au niveau des chloroplastes que se produit la photosynthèse. Les chloroplastes sont constitués d'une double membrane externe, d'une membrane interne et du stroma. La membrane interne forme un réseau (fig. 2c) dans lequel nous retrouvons les thylacoïdes qui s'empilent pour nous donner un granum qui est relié à un autre granum par une lamelle intergranulaire. Toute la membrane interne baigne dans le stroma.

La membrane interne des chloroplastes se compose d'une couche de lipides et de protéines formant une structure bimoléculaire (fig. 3a). Durant la phase lumineuse de la photosynthèse, les antennes collectrices captent l'énergie solaire puis l'acheminent vers les centres réactionnels des photosystèmes. Ensuite, à partir des centres réactionnels un transfert d'électron se produit. Le transfert se fait grâce à un ensemble de réactions d'oxydo-réduction, en présence de donneurs et d'accepteurs ayant des potentiels rédox différents. L'ensemble de ces réactions est représenté dans le schéma en Z de la figure 3b.

En plus des lipides et des protéines, nous trouvons aussi dans la membrane photosynthétique deux groupes de pigments, les chlorophylles et les caroténoïdes. Le rôle principal de ces pigments est d'absorber l'énergie électromagnétique et de la transférer vers les centres réactionnels des photosystèmes.

Lorsque nous prenons le spectre d'action de la photosynthèse et que nous le comparons aux différents spectres d'absorption des pigments

a)



b)

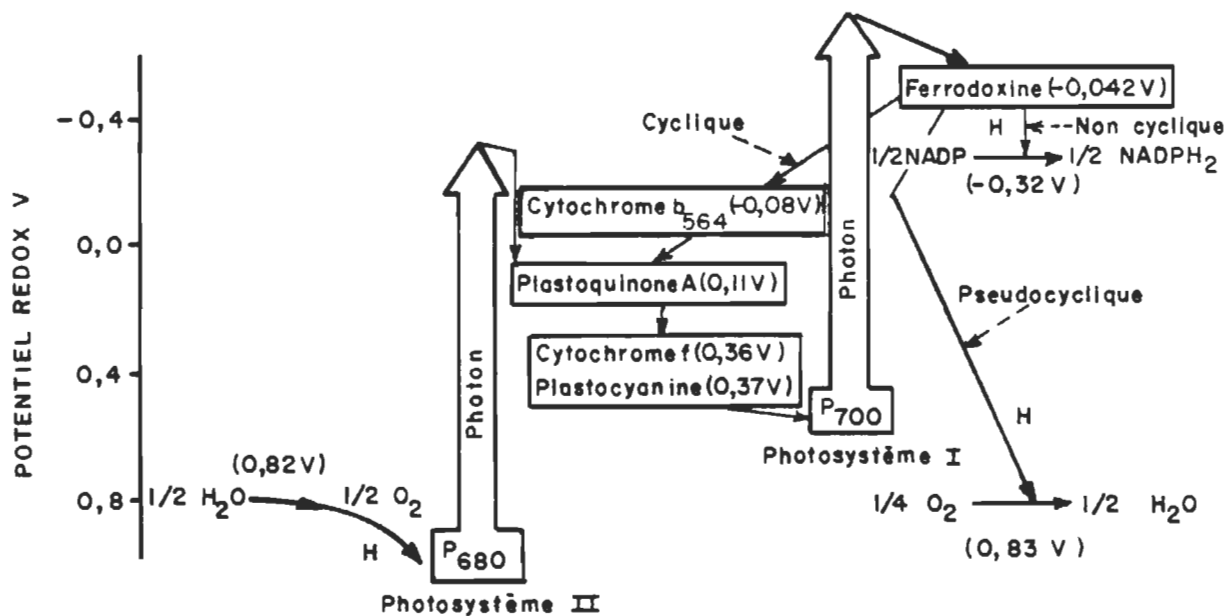


Figure 3. Schémas représentant la membrane photosynthétique (a) et le potentiel rédox des réactions photosynthétiques (b) (Tiré de Nobel, 1983).

présents dans la membrane photosynthétique (fig. 4), nous nous rendons compte que l'ensemble des pigments absorbent de l'énergie électromagnétique lors de la photosynthèse, mais à des proportions différentes suivant le pigment.

B) Spectroscopie d'absorption

Si nous examinons le pic d'absorption de la bande rouge des chloroplastes, nous notons que la largeur de bande à mi-hauteur est plus grande que celle de la chlorophylle-a dissoute dans un solvant polaire. Ce fait expérimental signifie que nous sommes en présence de différentes formes spectroscopiques de la chlorophylle-a (Lehninger, 1975). Cet état du pigment est expliqué par une interaction avec les molécules de protéine, ce qui donne des formes spectroscopiques différentes suivant l'orientation du pigment par rapport à la membrane des thylacoïdes (Bretton and Vermeiglio, 1982).

En connaissant la position des moments de transition des pigments, nous pouvons obtenir des renseignements sur l'orientation de ces pigments dans la membrane photosynthétique. La position des moments de transition des différentes chlorophylles est connue (Sauer, 1975 et Bauman and Wrobel, 1980). Pour la chlorophylle-a, nous savons que le moment de transition Y se localise dans le plan de l'anneau porphyrine,

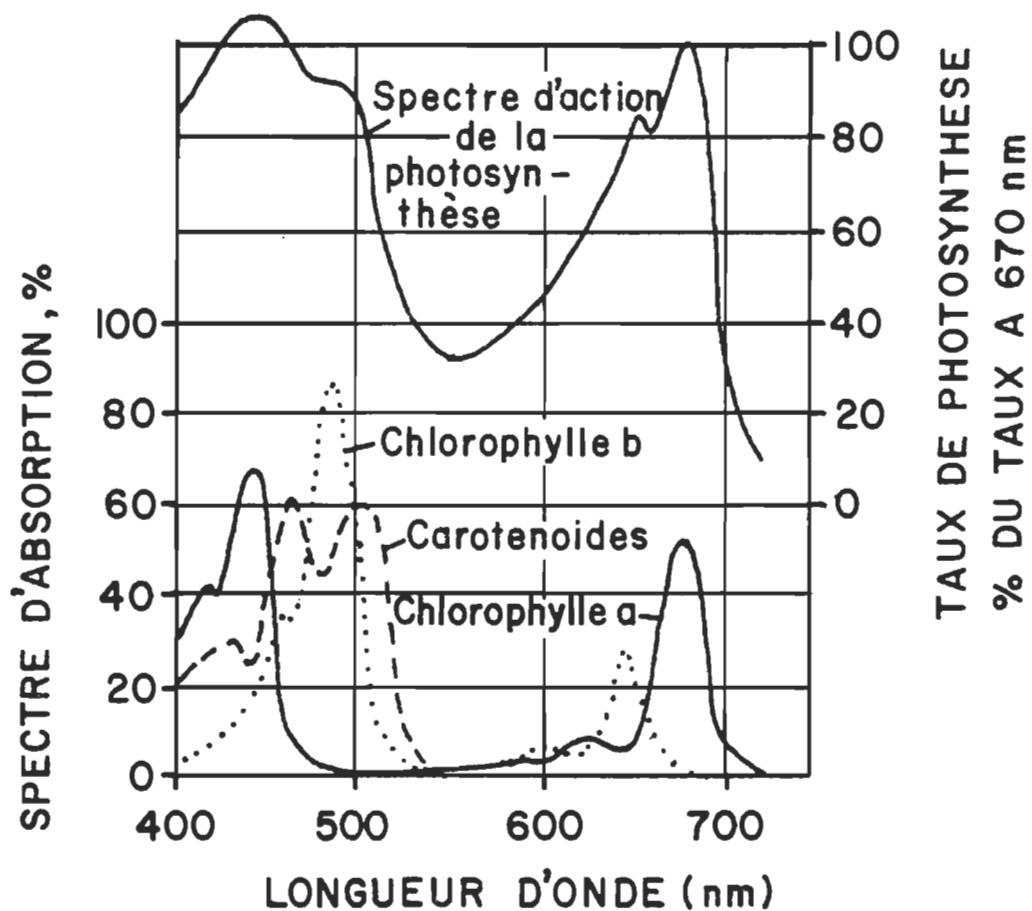


Figure 4. Comparaison entre les spectres d'absorption des chlorophylles-a et b, des caroténoïdes et le spectre d'action de la photosynthèse (Tiré de Lenhner, 1975).

le long d'une ligne reliant les pyrolles I et III tandis que le moment de transition X se situe le long de la ligne reliant les pyrolles II et IV (fig. 5).

Les moments de transition peuvent être dans des états différents. Et ces états correspondent aux bandes du spectre d'absorption des molécules. Ainsi nous connaissons (Petke et al., 1979) pour la chlorophylle-a, l'attribution des bandes d'absorption. A la figure 6, nous donnons une représentation du spectre d'absorption. Une des transitions est celle passant, de l'état fondamental au premier état excité ($S_0 \rightarrow S_1$) c'est la transition Q. Cette transition peut se situer le long des axes Y et X de la chlorophylle-a. Les transitions QY et QX absorbent respectivement la lumière à environ 662 nm et 613 nm lorsque le solvant est l'éther éthylique (Petke et al., 1979). Par contre, la bande de Soret de la chlorophylle-a se compose de transition électronique de type B, c'est-à-dire de transitions se produisant lorsque la molécule passe de l'état fondamental au deuxième état excité ($S_0 \rightarrow S_2$). Dans la région de la bande de Soret, il existe une superposition de plusieurs états vibrationnels pouvant être orientés selon les axes Y et X de la chlorophylle a.

En changeant le solvant dans lequel baigne la chlorophylle, la longueur d'onde du maximum d'absorption sera modifiée. Ainsi, en dissolvant la chlorophylle-a dans de la lécithine, le maximum de la transition QY est à 670 nm (Hoff, 1974), soit un déplacement de 8 nm par rapport à

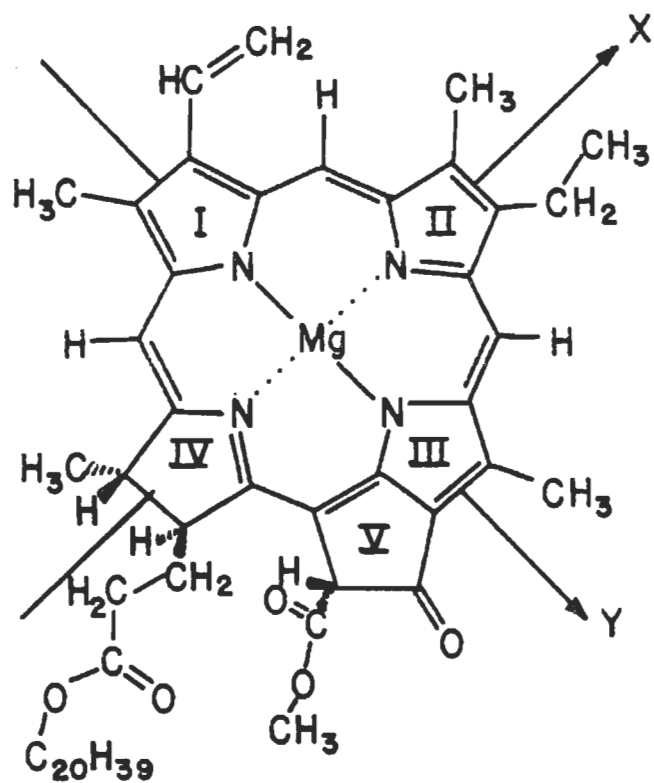


Figure 5. Structure moléculaire de la chlorophylle-a (Tiré de Salisbury and Ross, 1978).

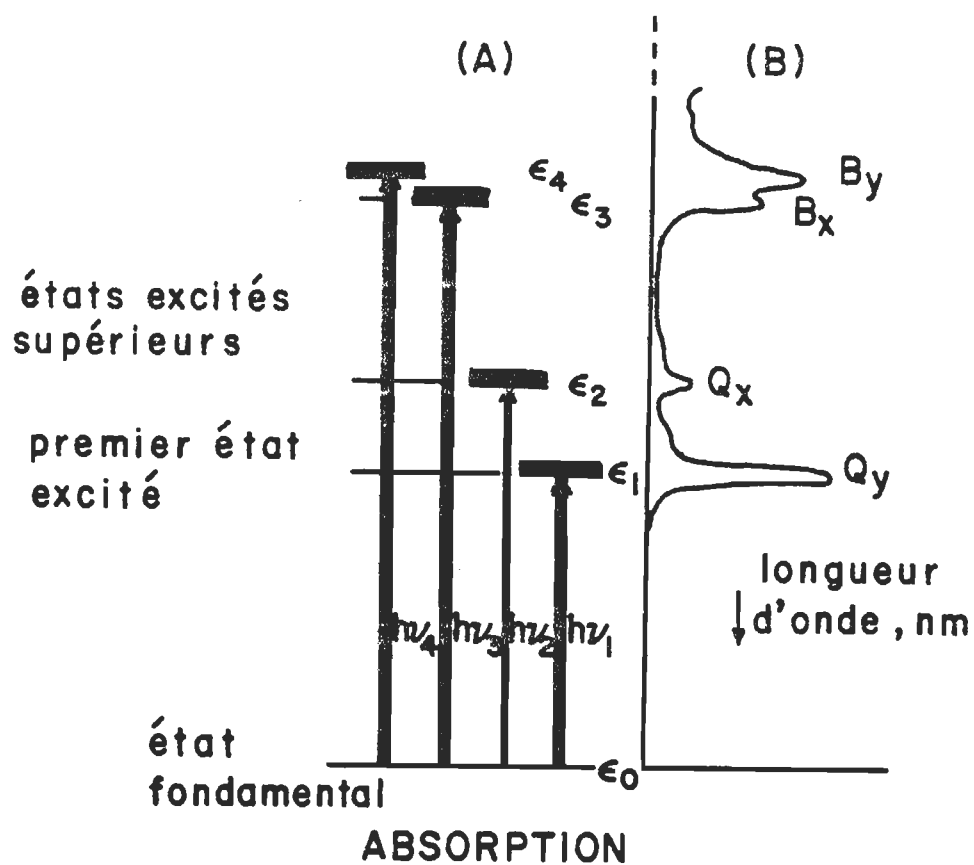


Figure 6. Diagramme des niveaux énergétiques de la chlorophylle-a (A) et leur position sur le spectre d'absorption (B) (Tiré de Sauer, 1975).

l'éther éthylique. Donc l'environnement joue un rôle important car il influence les propriétés spectroscopiques des molécules.

Comme les pigments présents dans les chloroplastes et les thylacoïdes sont orientés et qu'ils ont différentes formes spectroscopiques, nous pourrons, en utilisant de la lumière polarisée au lieu de la lumière naturelle, obtenir des informations supplémentaires quant à leur orientation dans la membrane photosynthétique et leur contribution aux différentes formes spectroscopiques.

C) Spectroscopie en lumière polarisée

Le choix de la méthode pour orienter les échantillons biologiques est très important. L'orientation peut s'effectuer par anisotropie de forme (Morita and Miyazaki, 1971 et Rafferty and Clayton, 1978), chimique (Hoff, 1974), magnétique (Breton, 1974), électrique (Gagliano et al., 1979), ainsi que par photosélection (Paillotin et al., 1979). Pour notre travail, nous utilisons l'anisotropie de forme, pour ce faire nous incorporons les chloroplastes et les thylacoïdes dans des films d'alcool de polyvinyle. Ce qui va nous donner un film isotrope, que nous allons étirer, dans le but d'obtenir un film anisotrope.

Une fois que nous aurons nos échantillons, nous voulons prendre des spectres de dichroïsme linéaire et d'émission polarisée. Ceci dans le but de comparer avec les études en dichroïsme linéaire sur les

chloroplastes (Breton and Paillotin, 1977), les thylacoïdes (Szito et al., 1985) et les antennes collectrices (Vacek et al., 1977) et de proposer un nouveau modèle sur le transfert d'énergie dans la membrane photosynthétique. De plus, quelques études ont porté sur la spectroscopie d'émission polarisée des chloroplastes, p. ex. Ganago et al. (1983).

La spectroscopie photoacoustique est un outil de recherche très employée depuis que Rosencwaig (1973) a mis au point cette technique spectroscopique appliquée aux solides. Elle sert à étudier des métaux (Benziger et al., 1985), des molécules (Upadhyaya et al., 1985), des organismes vivants (Carpentier et al., 1983), etc. Les études peuvent s'effectuer à température de la pièce ou à basse température (Ikari et al., 1984). La spectroscopie photoacoustique sert aussi pour étudier des événements se produisant lors de la photosynthèse, tels que l'emmagasinement de l'énergie et l'évolution de l'oxygène dans les feuilles intactes (Kanstad et al., 1983 et Poulet et al., 1983). Nous pouvons en savoir plus sur les possibilités de la spectroscopie photoacoustique pour la recherche en photosynthèse, en se référant à l'article de Buschmann et al. (1984). Cependant, à notre connaissance, il n'y a aucun travail publié sur des chloroplastes et des thylacoïdes en spectroscopie photoacoustique polarisée.

D) But du travail

Afin d'être à même de comprendre le mécanisme de transfert d'énergie se produisant dans la membrane photosynthétique, nous nous proposons d'extraire des chloroplastes et des thylacoïdes pour ensuite les incorporer dans un film d'alcool de polyvinyle que nous pouvons par la suite étirer. Notre but est de former deux types de milieu, un milieu isotrope et un milieu anisotrope correspondant respectivement à des films non-étiré et étiré.

L'objectif de notre étude est d'examiner l'effet de l'orientation des pigments photosynthétique en employant les techniques spectroscopiques d'absorption, d'excitation, d'émission et de photoacoustique. Afin de caractériser les phénomènes spectroscopiques propres à l'orientation des pigments, on se propose d'utiliser la lumière naturelle et la lumière polarisée. Les données expérimentales ainsi obtenues permettront d'apporter une plus grande compréhension du mécanisme de transfert d'énergie dans un système modèle favorisant l'orientation des fragments photosynthétiques. L'incidence d'une telle étude par rapport aux observations expérimentales *in vivo* permettra de démontrer l'importance de l'orientation des pigments pour une conversion efficace de l'énergie électromagnétique, en particulier dans le mécanisme de transfert d'énergie.

CHAPITRE II

THÉORIE

Dans la présente section, nous présentons les théories dont nous nous servons dans le cadre du présent travail.

A) Relation entre la déformation mécanique et l'anisotropie optique des échantillons

Afin d'établir les mécanismes responsables du dichroïsme linéaire observé, nous étudierons la relation entre la déformation mécanique et l'anisotropie optique.

En étirant les films d'alcool de polyvinyle, nous pouvons déformer les particules incorporées, dépendamment de leur taille. Les chloroplastes et les thylacoïdes, pour leur part, subissent une déformation lors de l'étirement du film. L'équation (1) nous donne la relation permettant de calculer l'indice de déformation mécanique (D).

$$D \left(\frac{h^b}{v^b} \right) = \left(\frac{h^a}{v^a} \right) \quad (1)$$

où les indices b et a représentent respectivement l'état du film, soit

avant ou après étirement. Et les paramètres h et v , se mesurent en prenant la longueur (h) et la largeur (v) des chloroplastes et des thylacoïdes.

En étirant les films d'alcool de polyvinyle, nous observons une anisotropie optique. Cette anisotropie peut être due à une réorientation des moments de transition des molécules absorbant la lumière. Ainsi, les composantes parallèles ($M_{||}$) et perpendiculaire (M_{\perp}) des moments de transition (\vec{M}) vont varier selon l'équation (2) lors de l'étirement du film.

$$\Delta \cdot \left(\frac{M_{||}^b}{M_{\perp}^b} \right) = \left(\frac{M_{||}^a}{M_{\perp}^a} \right) \quad (2)$$

où Δ est le facteur d'anisotropie optique.

Le coefficient d'extinction (ϵ) et l'absorbance (A) sont proportionnels à $(\vec{E} \cdot \vec{M})^2$, où \vec{E} correspond au vecteur électrique de la lumière polarisée. Ainsi nous obtenons pour les composantes polarisées,

$$A_{||} \sim (E_{||} \cdot M_{||})^2 \text{ et } A_{\perp} \sim (E_{\perp} \cdot M_{\perp})^2 \quad (3)$$

A partir des relations (2) et (3), nous obtenons,

$$\Delta \cdot \left(\frac{A_{||}^b}{A_{\perp}^b} \right)^{\frac{1}{2}} = \left(\frac{A_{||}^a}{A_{\perp}^a} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (4)$$

Le facteur d'anisotropie optique (Δ) se calcule à partir de l'équation (4). Les valeurs de l'absorbance (A) sont mesurées à 675 nm pour les systèmes photosynthétiques étudiés.

En employant les valeurs de Δ et de D, nous calculons le facteur d'efficacité de l'orientation (Δ/D) des chloroplastes et des thylacoïdes.

B) Dichroïsme linéaire

Le dichroïsme linéaire, c'est le phénomène de l'absorption anisotrope de la lumière par un échantillon contenant des molécules orientées. Pour que l'absorption soit à son maximum, le vecteur de la lumière doit être polarisé parallèlement aux moments de transition. Mais si par contre, la lumière est polarisée perpendiculairement aux moments de transition des molécules, aucune absorption ne s'observe.

Pour prendre des mesures de dichroïsme linéaire, la méthode la plus simple consiste à se servir d'un spectrophotomètre et de polariseurs. Mais, il existe aussi des appareils servant à mesurer directement le dichroïsme linéaire. Pour notre part, nous nous servons d'un spectrophotomètre pour mesurer les composantes d'absorption parallèle (A_{\parallel}) et perpendiculaire (A_{\perp}).

A partir de l'absorption parallèle et perpendiculaire, nous calculons le dichroïsme linéaire (DL) à l'aide de deux méthodes différentes qui nous sont données par les équations (5) et (6).

$$\Delta A = A_{\parallel} - A_{\perp} \quad (5)$$

$$DL = \left(\frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{A} \right) = \left(\frac{A_{\parallel} - A_{\perp}}{A_{\parallel} + 2A_{\perp}} \right) \quad (6)$$

Pour pouvoir comparer les valeurs de dichroïsme linéaire que nous calculons à celles de la littérature, il est important de s'assurer que ce soit le même dichroïsme linéaire, car certains auteurs emploient le même terme pour des entités différentes.

Prenons l'équation (5), certains auteurs utilisent le terme ΔA (Breton et al., 1973), alors que d'autres le remplace par DL (Biggins and Svejksky, 1980 et Breton and Roux, 1971).

A l'équation (6), nous retrouvons une autre définition pour le dichroïsme linéaire, soit $DL = (A_{\parallel} - A_{\perp})/A$, mais nous pouvons aussi trouver dans la littérature que le dichroïsme est égal à $\Delta A/A$ (Morita and Miyazaki, 1971) ou que le dichroïsme réduit s'exprime par l'expression LD/A_{iso} (Norden, 1978). Cependant, ces différentes équations ont la même signification.

A partir des absorbances parallèle et perpendiculaire, nous pouvons aussi calculer le rapport dichroïque (DR) (Bolt and Sauer, 1979 et Norden, 1978).

$$DR = \frac{A_{\parallel}}{A_{\perp}} \quad (7)$$

Il est donc bien important, lorsque nous discutons de dichroïsme linéaire, d'établir ce que nous entendons par ce terme.

C) Spectroscopie photoacoustique

La spectroscopie photoacoustique est une méthode relativement nouvelle, bien que les premières publications (Bell, 1881) datent d'un siècle. En effet, l'application de cette méthode à des solides n'a qu'une vingtaine d'années (Parker, 1973).

Rosencwaig et Gersho (1975) établirent la théorie de la spectroscopie photoacoustique. Pour observer un signal photoacoustique, nous plaçons un échantillon dans une cellule (fig. 7a) à laquelle s'attache un microphone, et l'éclairons avec une lumière modulée. L'échantillon absorbe la lumière et la transforme partiellement ou totalement en chaleur, via le processus de la désactivation non-radiative. Le microphone sert à détecter la variation de pression produite dans la cellule par le réchauffement périodique du gaz à la surface de l'échantillon.

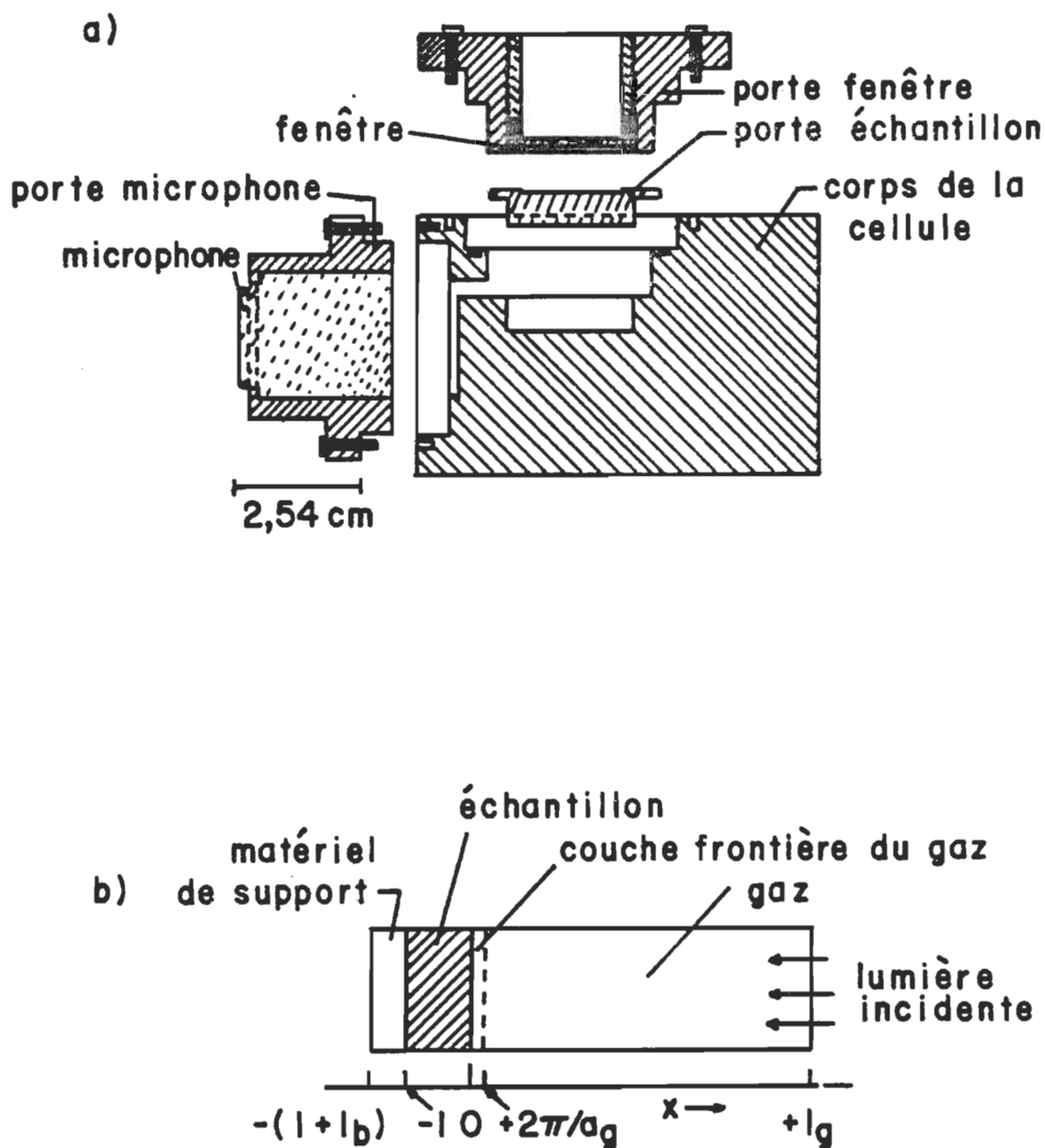


Figure 7. Schéma d'une cellule photoacoustique (a) (Tiré de Ducharme et al, 1979) ainsi que la représentation d'une coupe longitudinale de la cellule (b) (Tiré de Rosencwaig, 1978). l , l_b et l_g représentent respectivement les épaisseurs de l'échantillon, du matériel de support et du gaz. a_g représente le coefficient de diffusion thermique du gaz.

Pour comprendre la théorie de la spectroscopie photoacoustique des solides, nous devons considérer la cellule comme étant un cylindre (fig. 7b) de diamètre D et d'une longueur L et l'échantillon comme un disque de diamètre D et d'épaisseur ℓ . L'échantillon se place de manière à exposer une surface du disque au gaz, une colonne d'épaisseur ℓ_g et que l'autre surface repose sur le matériel de support, d'épaisseur ℓ_p . Nous considérons que le gaz et le matériel de support n'absorbent pas la lumière.

En spectroscopie photoacoustique, la lumière incidente doit se comporter comme une lumière sinusoïdale monochromatique modulée. Et nous assumons que la lumière arrive à l'échantillon avec une intensité (I) correspondante à l'équation (8)

$$I = \frac{1}{2} I_0 (1 + \cos \omega t) \quad (8)$$

où I_0 représente le flux de la lumière incidente monochromatique (W/cm^2) et ω sa fréquence de modulation (radians/s).

La densité de chaleur produite dans l'échantillon à un point x , à la suite de l'absorption de la lumière modulée s'exprime à partir de l'équation suivante:

$$\frac{1}{2} \beta I_0 e^{\beta x} (1 + \cos \omega t) \quad (9)$$

où β représente le coefficient d'absorption optique de l'échantillon (cm^{-1}).

L'onde de chaleur formée dans l'échantillon se propage selon l'équation de la diffusion thermique (10) pour un x compris entre $-\ell$ et 0.

$$\frac{\delta^2 \phi}{\delta x^2} = \frac{1}{\alpha_s} \frac{\delta \phi}{\delta t} - A e^{\beta x} (1 + e^{i\omega t}) \quad (10)$$

où A est une constante égale à $\beta I_0 \eta / 2K_s$, η représente l'efficacité d'absorption de l'échantillon à la longueur d'onde d'excitation, K_s la conductivité thermique de l'échantillon et α_s la diffusivité thermique de l'échantillon (cm^2/s) qui est donnée par l'équation (11)

$$\alpha_j = K_j / \rho_j c_j \quad (11)$$

où K représente la conductivité thermique ($\text{cal}/\text{cm} \cdot \text{s} \cdot ^\circ\text{C}$), ρ la densité (g/cm^3) et c la chaleur spécifique ($\text{cal}/\text{g} \cdot ^\circ\text{C}$). Quant à l'indice j , il identifie respectivement les indices s , g et b attribués à l'échantillon, le gaz et le matériel de support.

Des équations de diffusion thermique identiques à celle de l'équation (10) peuvent être déterminées pour le matériel de support (12) et pour le gaz (13).

$$\frac{\delta^2 \phi}{\delta x^2} = \frac{1}{\alpha_b} \frac{\delta \phi}{\delta t} \quad \text{pour} \quad -(\ell + \ell_b) \leq x \leq -\ell \quad (12)$$

$$\frac{\delta^2 \phi}{\delta x^2} = \frac{1}{\alpha_g} \frac{\delta \phi}{\delta t} \quad \text{pour} \quad 0 \leq x \leq \ell_g \quad (13)$$

Nous savons que le gaz et le matériel de support n'absorbent pas de lumière, donc la formation de chaleur se situe exclusivement dans l'échantillon. A l'interface gaz-échantillon, il existe une amplitude complexe du flux de chaleur périodique, cette amplitude (θ) nous est donnée à l'équation (14).

$$\theta = \frac{\beta I_o}{2K_s (\beta^2 - \sigma_s^2)} \quad (14)$$

$$\times \left[\frac{(r-1)(b+1)e^{\sigma_s \ell} - (r+1)(b-1)e^{-\sigma_s \ell} + 2(b-r)e^{-\beta \ell}}{(g+1)(b+1)e^{\sigma_s \ell} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_s \ell}} \right]$$

où σ_s est égale à $(1+i)a_s$ et a_s le coefficient de diffusion thermique (cm^{-1}) de l'échantillon se définit comme étant égal à $(\omega/2\alpha_s)$. De plus b , g et r sont des constantes, qui prennent respectivement les valeurs de $k_b a_b / k_s a_s$, $k_g a_g / k_s a_s$ et $(1-i)\beta/2a_s$.

Cependant, ce n'est pas toute la colonne de gaz qui répond thermiquement au flux de chaleur périodique formé à la surface de l'échantillon. Nous présentons à la figure 8 la distribution de la température dans le gaz en fonction du temps. Nous notons que la température s'atténue rapidement lorsque la distance augmente par rapport à la surface de l'échantillon. A une distance de $2\pi/a_g$, la variation du flux de température périodique est pratiquement nulle. Nous pouvons donc définir que l'épaisseur active, $2\pi/a_g$, répond thermiquement au flux de chaleur périodique de l'échantillon.

A l'interface gaz-échantillon, un échauffement périodique se produit ce qui favorise une expansion et une contraction périodique du gaz. Nous avons donc un phénomène périodique qui agit comme un piston acoustique sur la colonne de gaz. Le déplacement du piston acoustique s'évalue facilement. En se servant de la loi des gaz parfaits, nous pouvons calculer l'enveloppe de pression sinusoïdale, soit la valeur Q.

$$Q = \frac{\beta I_o \gamma P_o}{2\sqrt{2} K_s l_g a_g T_o (\beta^2 - \sigma_s^2)} \quad (15)$$

$$X \left[\frac{(r-1)(b+1)e^{\sigma_s l} - (r+1)(b-1)e^{-\sigma_s l} + 2(b-r)e^{-\beta l}}{(g+1)(b+1)e^{\sigma_s l} - (g-1)(b-1)e^{-\sigma_s l}} \right]$$

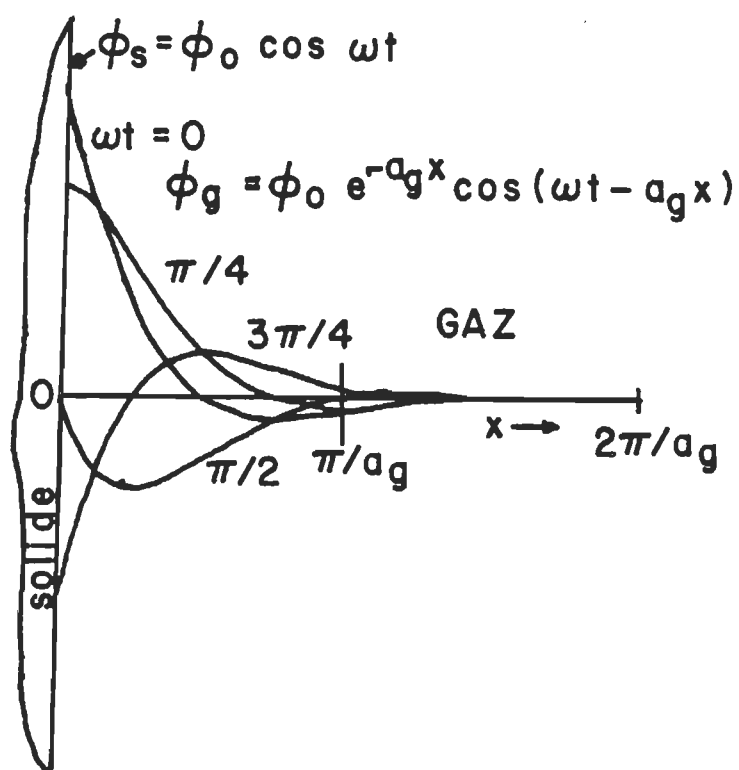


Figure 8. Distribution spatiale de la température en fonction du temps dans la couche de gaz adjacente au solide (Tiré de Rosencwaig, 1978).

où γ représente le rapport des chaleurs spécifiques, P_0 la pression ambiante et T_0 la température ambiante.

Dans la théorie de Rosencwaig et Gersho (1975) trois paramètres de l'échantillon doivent être considérés pour l'analyse du signal photoacoustique, soit l'épaisseur de l'échantillon ℓ , la longueur d'absorption optique μ_β et la longueur de diffusion thermique μ_s . Les valeurs de μ_β et μ_s nous sont données par l'inverse des coefficients d'absorption optique (β) et de diffusion thermique (a_s).

De plus nous savons (Rosencwaig, 1978) que l'amplitude du signal acoustique est fonction de la fréquence de modulation de la lumière incidente. Ainsi, le signal sera plus important aux basses fréquences de modulation.

D) Calcul de la désactivation thermique à partir de composantes gaussiennes des spectres d'absorption et de photoacoustique

A partir des spectres d'absorption et de photoacoustique, nous pouvons, en divisant l'intensité du signal photoacoustique (PAS), par celle du spectre d'absorption (A), obtenir un indice de la désactivation thermique (DT) de l'échantillon. La désactivation thermique c'est une mesure de l'énergie lumineuse absorbée par les pigments qui est dissipée sous forme de chaleur.

$$DT = PAS/A \quad (16)$$

De la même façon nous pouvons obtenir:

$$DT = PAS / A \quad (17)$$

$$DT_{\perp} = PAS_{\perp} / A_{\perp} \quad (18)$$

Une fois que les valeurs de la désactivation thermique sont obtenues pour les chloroplastes et les thylacoïdes, il est intéressant de pouvoir relier ces valeurs à des pigments ou à des complexes pigmentprotéine par l'étude des composantes gaussiennes.

Une première approximation sera faite à partir des données de Litvin et Sineshchekov (1975). Ces derniers établirent la présence d'un certain nombre de composantes gaussiennes pour la bande dans le rouge. En utilisant ces valeurs, nous calculons les gaussiennes présentes dans la bande de Soret, en estimant qu'il existe un déplacement de 240 nm pour les composantes des deux pics (voir tableau 1).

Pour les spectres de photoacoustique, nous estimons les mêmes valeurs de maximum et de largeur de bande à mi-hauteur que pour les spectres d'absorption. Une fois les valeurs des composantes gaussiennes des spectres de photoacoustique et d'absorption déterminées, nous calculons la désactivation thermique des différentes composantes.

Tableau 1

Maximum et largeur à mi-hauteur des composantes gaussiennes .

Longueur d'onde (nm)	Largeur à mi-hauteur (nm)	Longueur d'onde (nm)	Largeur à mi-hauteur (nm)
640	9	400	9
648	8	408	8
662	10	422	10
668	8	428	8
676	8	436	8
682	8	442	8
687	7,5	447	7,5
693	7,5	453	7,5
698	7	458	7
702	29	462	29
703	8-10	463	8-10
704	30	464	30
706	32	466	32
707	10	467	10
710	36	470	36
712	10-12	472	10-12
738	9-11	498	9-11
755	11-12	515	11-12

CHAPITRE III

MATÉRIEL ET MÉTHODE

A) Extraction et purification des chloroplastes et des thylacoïdes

Nous extrayons les chloroplastes et les thylacoïdes à l'aide de deux méthodes différentes. La première extraction (préparation 1 - p1) se fait à partir de feuilles de pois, selon la méthode de Burke et al. (1978). Deux types d'échantillons ont été préparés, soit des chloroplastes et des thylacoïdes. Cette préparation a eu lieu dans le laboratoire du Professeur Frackowiak à Poznan (Pologne).

Pour la deuxième extraction (préparation 2 - p2), nous utilisons des feuilles d'haricot en appliquant la méthode de Reeves et Hall (1980). A partir de la même extraction, nous purifions trois types d'échantillon, soit i) des chloroplastes entiers, ii) des chloroplastes brisés et iii) des thylacoïdes.

Lorsque nous soulignons l'emploi de chloroplastes entiers, nous signifions que l'enveloppe externe est intacte. Par contre, dans le cas des chloroplastes brisés, l'enveloppe externe subit des cassures à la

suite d'un choc osmotique. Les thylacoïdes s'obtiennent eux en enlevant l'enveloppe externe des chloroplastes (voir fig. 2).

Pour la deuxième extraction, nous nous servons de plants d'haricot âgés de dix jours. Nous coupons les tiges en morceaux pour les passer dans un broyeur pendant dix secondes. Par la suite, nous filtrons la solution obtenue sur quatre épaisseurs de coton à fromage et sur un filet de nylon (25 μ m). Nous centrifugeons le filtrat à 3 500 rpm pour une durée de 30 secondes, le surnageant est jeté, et nous remettons le culot en suspension dans 1 ml de tampon de resuspension pour obtenir les chloroplastes entiers (Reeves and Hall, 1980). Nous utilisons comme tampon d'extraction une solution 0,33 M Sorbitol, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, 4 mM MgCl_2 et 2 mM d'acide ascorbique à pH 6,5. Et pour le tampon de resuspension, nous préparons une solution 2 mM de EDTA, 1 mM MgCl_2 , 1 mM MnCl_2 , 50 mM Hepes et 0,33 M de Sorbitol (sauf indication contraire) à pH 7,6.

Les chloroplastes brisés s'obtiennent en plaçant les chloroplastes entiers dans un tampon de resuspension qui ne contient pas de sorbitol. Comme la solution est hypotonique, l'enveloppe externe des chloroplastes se brise. Par la suite, nous centrifugeons la solution et récupérons le culot, pour le suspendre dans le tampon de resuspension et nous obtenons ainsi les chloroplastes brisés.

Pour obtenir les thylacoïdes, nous prenons les chloroplastes brisés et nous les passons dans un broyeur. Par la suite, nous plaçons la

suspension sur un gradient de sucrose et nous centrifugeons pour finalement récupérer les thylacoïdes (Reeves and Hall, 1980).

Une fois que les trois types d'échantillons sont purifiés (chloroplastes entiers, chloroplastes brisés et thylacoïdes), nous pouvons passer à la prochaine étape pour obtenir nos échantillons, soit la préparation des milieux isotrope et anisotrope.

B) Préparation des milieux isotrope et anisotrope

Les milieux isotrope et anisotrope s'obtiennent en incorporant le matériel biologique dans des films d'alcool de polyvinyle (Frackowiak et al., 1986b). Pour préparer les films, nous mélangeons 100 ml d'eau distillée et dix grammes d'alcool de polyvinyle (BDH). Nous plaçons le mélange dans un bain thermostaté à 50°C, et agitons jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Avant l'incorporation du matériel biologique, nous devons laisser refroidir le mélange jusqu'à température ambiante. Nous ajoutons les chloroplastes et les thylacoïdes en agitant à l'aide d'une tige de verre, puis nous laissons reposer le mélange afin de permettre à l'air de s'échapper du polyvinyle.

En utilisant une tige de verre, nous déposons le mélange sur une lame de verre qui fut préalablement lavée avec de l'acide No-Chromix, puis au NaOH (0,1 M) et rincée dix fois à l'eau du robinet et dix fois à

l'eau distillée. Nous devons porter attention à ce qu'aucune bulle d'air ne se forme sur le film d'alcool de polyvinyle. Si cela se produit, nous pouvons retirer les bulles formées à l'aide d'une seringue. Nous plaçons ensuite les lames de verre, sur lesquelles nous retrouvons les chloroplastes et les thylacoïdes incorporés dans les films d'alcool de polyvinyle, dans un dessiccateur contenant du sulfate de calcium (CaSO_4) pour une période de 48 heures. Après cette période, il ne reste qu'à décoller le film d'alcool de polyvinyle de la lame pour avoir des chloroplastes ou des thylacoïdes incorporés dans un milieu isotrope.

Pour former un milieu anisotrope, nous utilisons le film isotrope et l'étirons pour obtenir le degré d'anisotropie désiré. Le degré d'anisotropie (%) se calcule selon la formule suivante:

$$\% = \frac{(L_F - L_i)}{L_i} \times 100 \quad (19)$$

où L_F et L_i correspondent respectivement aux longueurs finale et initiale du film.

Pour étirer le film d'alcool de polyvinyle, nous nous servons d'un support. Le film se fixe à deux barrières, une des barrières est immobile, l'autre se déplace à l'aide d'une vis (voir fig. 9). L'ensemble baigne dans un milieu saturé en vapeur d'eau pour une période de 24 heures pour humidifier le film afin de pouvoir l'étirer sans qu'il ne se déchire. Après cette période d'humidification, nous pouvons étirer le

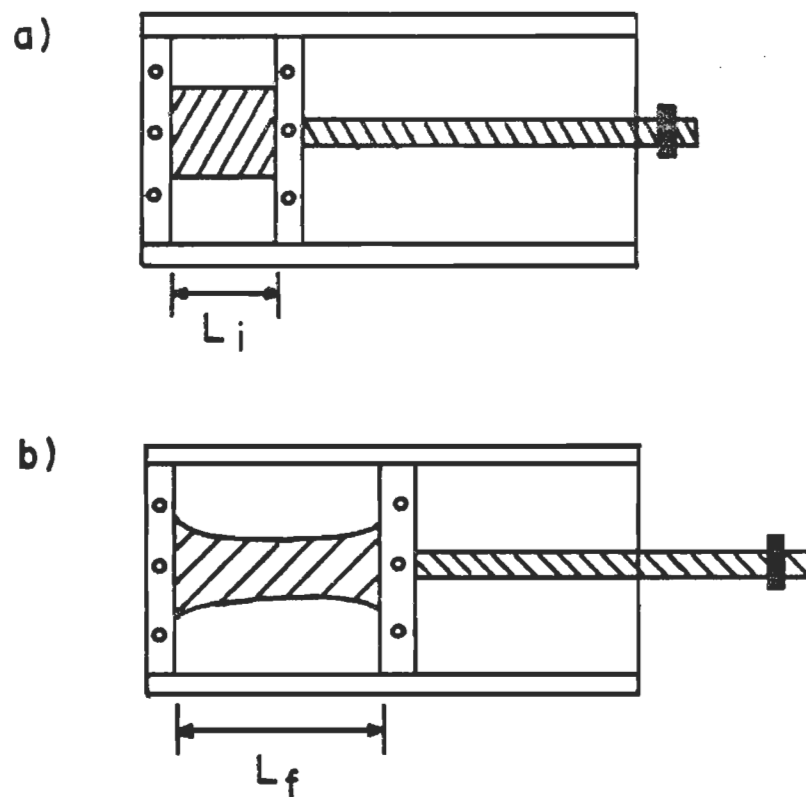


Figure 9. Schémas du support servant à étirer les films d'alcool de polyvinyle en position initiale (a) et finale (b). L_i et L_f représentent respectivement les longueurs initiale et finale du film d'alcool de polyvinyle.

film jusqu'au degré d'anisotropie désiré, soit 300% dans notre cas. Ensuite, nous laissons le film sur le cadre pour une période de séchage de 48 heures avant son utilisation pour les mesures expérimentales.

C) Photographies

Afin de déterminer si nos échantillons sont orientés lors de l'étirement des films d'alcool de polyvinyle, nous avons pris des photographies des échantillons à l'aide d'un microscope à fluorescence Laborlux 12 (Leitz).

D) Spectroscopie en lumière polarisée

En considérant la stabilité des chloroplastes et des thylacoïdes une fois incorporés dans l'alcool de polyvinyle, il nous est possible en utilisant le même échantillon de mesurer différents paramètres spectroscopiques, en particulier en absorption, émission et photoacoustique.

a) Absorption

Les mesures d'absorption ont été prises avec un spectrophotomètre Cary 17-D. Pour chaque échantillon nous prenons une série de trois spectres: le premier en présence de lumière naturelle (A_{η}),

le deuxième et le troisième respectivement avec de la lumière polarisée parallèlement ($A_{||}$) et perpendiculairement (A_{\perp}) à l'échantillon.

Comme l'épaisseur des films d'alcool de polyvinyle varie d'un échantillon à l'autre, nous prenons un spectre d'absorption d'un film contenant des chloroplastes par rapport à l'air, puis dans un second temps, le spectre d'absorption d'un film d'alcool de polyvinyle par rapport à l'air. Ensuite nous normalisons les spectres d'absorption à une même épaisseur d'échantillon avant de soustraire le spectre d'absorption de l'alcool de polyvinyle de celui des chloroplastes.

b) Émission

Nous prenons les spectres d'excitation et d'émission à l'aide d'un spectrofluorimètre Fluorolog-2 (Spex). Pour avoir des spectres d'excitation et d'émission polarisés, nous plaçons un polariseur au faisceau d'excitation et un polariseur au faisceau d'émission (voir fig. 10). La lumière est polarisée selon un axe vertical (V) ou horizontal (H) aux deux faisceaux lumineux. Les échantillons sont toujours placés pour que l'axe d'étirement soit horizontal (h).

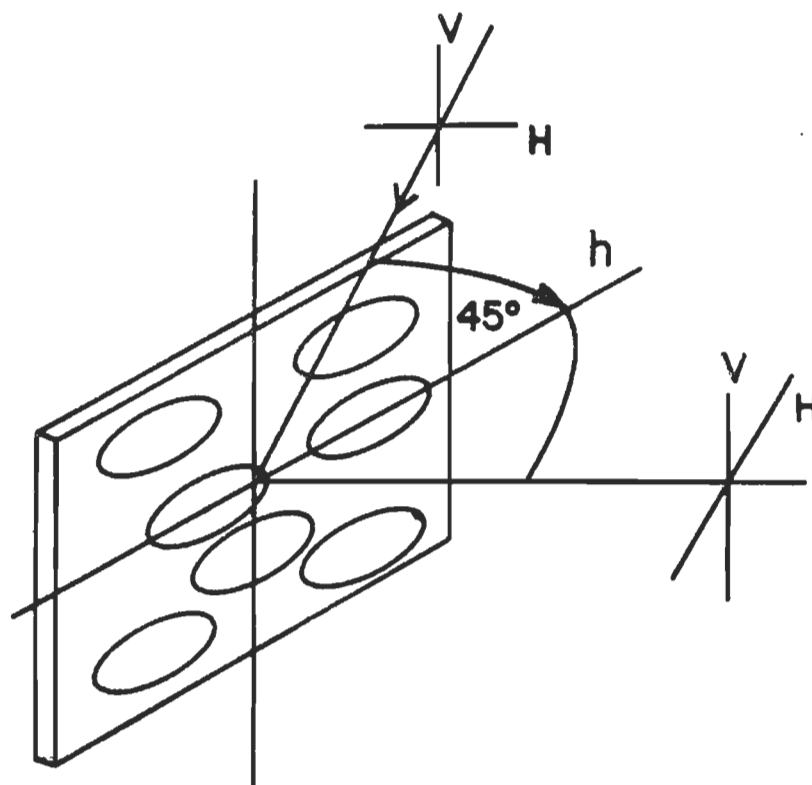


Figure 10. Représentation schématique des mesures d'excitation et d'émission de fluorescence. H et V représentent la polarisation horizontale et verticale.

c) Photoacoustique

La figure 11 présente le schéma du spectromètre photoacoustique à simple faisceau construit dans notre laboratoire. La source lumineuse incidente est une lampe au Xénon de 1 000 W (Schoeffel Inst. Corp.). Le faisceau lumineux passe au travers une lentille (L_1), puis d'un monochromateur à réseau (Schoeffel Inst. Corp., GMA250). Par la suite, le faisceau monochromatique est modulé à l'aide d'un disque rotatif mécanique relié à un modulateur de fréquence (Benthan 218F), puis la lumière passe dans une deuxième lentille (L_2) et dans un filtre (F), qui se positionne automatiquement pour des longueurs d'onde supérieures à 500 nm. Ensuite, le faisceau de lumière est réfléchi par un miroir avant d'être polarisé à l'aide d'une lentille polarisante (p), pour finalement atteindre l'échantillon placé à l'intérieur de la cellule. Un microphone détecte l'onde acoustique et la transforme en signal électrique qui est préamplifié avant d'être acheminé à un amplificateur différentiel (Ithaco/Dynatrac modèle 393), auquel est relié le modulateur de fréquence. Toutes les données provenant de l'amplificateur différentiel sont traitées par un micro-ordinateur.

Le noir de charbon est un matériel très absorbant qui dissipe sous forme de chaleur toute l'énergie absorbée. En prenant un spectre photoacoustique du noir de charbon, nous obtenons ainsi le profil de l'intensité lumineuse de la lampe. Nous devons donc

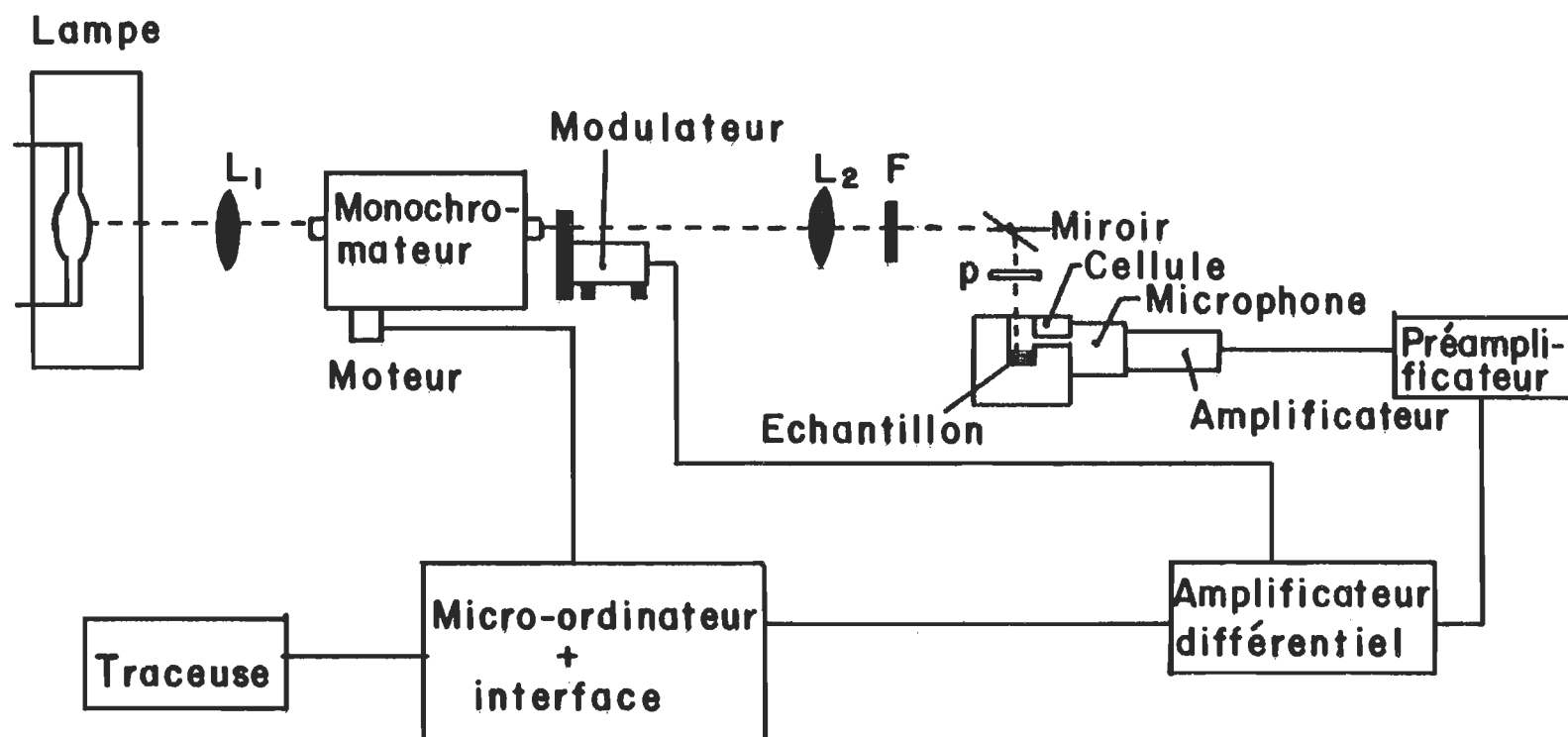


Figure 11. Schéma du spectrophotomètre photoacoustique. L_1 et L_2 représentent les lentilles, F le filtre et p le polariseur.

corriger le spectre photoacoustique de l'échantillon, en divisant le signal acoustique de l'échantillon par celui du noir de charbon.

Lorsque nous prenons un spectre photoacoustique d'un échantillon en lumière polarisée, nous devons le diviser par le spectre du noir de charbon pris aussi en lumière polarisée.

E) Mesure de la durée de vie de fluorescence

Les mesures de durée de vie de fluorescence ont été prises suivant deux méthodes expérimentales, soit par comptage de photon et par modulation de phase.

a) Comptage de photon

Pour ces mesures nous utilisons un appareil commercial de la compagnie PRA (modèle 3000). Les courbes de déclin obtenues à partir d'un échantillon sont ajustées à l'aide d'un ordinateur afin de trouver les composantes exponentielles présentes. Il doit y avoir une bonne corrélation entre la courbe expérimentale et celle calculée à partir des composantes exponentielles. L'ordinateur peut ajuster les courbes avec une, deux ou trois exponentielles ce qui permet de déterminer la durée de vie (τ) ainsi que l'amplitude de chaque composante.

b) Modulation de phase

En employant la méthode de modulation de phase, nous obtenons une durée de vie moyenne des différentes composantes de fluorescence ainsi que la complexité de la fluorescence à partir du rapport $M/\cos \psi$, où ψ représente le déplacement de la phase entre les faisceaux d'excitation et d'émission et M , le facteur de démodulation des faisceaux lumineux. Ainsi, lorsque $M/\cos \psi$ égale un, le déclin est monoexponentiel, et s'il est inférieur à un, il existe une superposition de plusieurs exponentiels. Dans ce cas, la valeur de la durée de vie (τ_ψ) est une moyenne des durées de vie des composantes présentes.

Les mesures de durée de vie de fluorescence par modulation de phase ont été prises à l'Institut de physique de l'Université Nichlolas Copernick à Torun (Pologne). La figure 12 présente un schéma de l'appareil utilisé dans notre travail. La source lumineuse (LS) est une lampe au mercure. La lumière incidente passe à travers un filtre interférentiel (FI), pour ensuite être modulée avec un modulateur ultrasonique (M). Le modulateur se situe entre deux polariseurs (P), servant à polariser la lumière horizontalement. Par la suite, le faisceau de lumière se divise en deux parties, l'une sert de référence pour mesurer la phase, l'autre est employée comme source lumineuse excitatrice.

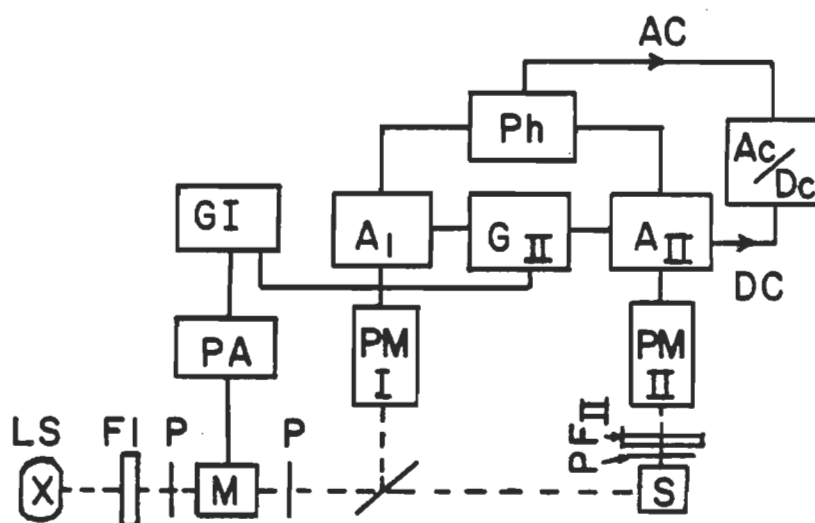


Figure 12. Schéma de l'appareil servant à mesurer la durée de vie de fluorescence par modulation de phase (SL: source lumineuse, F_I et F_{II} : filtres, P: polariseur, M: modulateur, S: échantillon, PA: amplificateur de puissance, G_I et G_{II} : générateurs locaux, A_I et A_{II} : amplificateurs, PM_I et PM_{II} : photomultiplicateurs, Ph: compteur de phase digitale, AC: courant alternatif et DC: courant continu).

Les mesures se prennent en deux étapes. Premièrement, nous devons mesurer la phase (ϕ_{μ}) et le facteur de démodulation (m_{μ}) pour la référence. On emploie comme référence un film d'alcool de polyvinyle. Deuxièmement, nous mesurons la phase (ϕ_{exc}) et le facteur de démodulation (m_{exc}) pour l'échantillon incorporé dans un film d'alcool de polyvinyle.

A partir de ces mesures, nous calculons le facteur de démodulation (M) et la phase (ψ) de l'échantillon. Ainsi,

$$M = \frac{m_{exc}}{m_{\mu}} \quad (20)$$

et

$$\psi = \frac{\phi_{\mu} - \phi_{exc}}{500} \quad (21)$$

Nous calculons la durée de vie moyenne, τ_{ψ} , à partir de l'équation suivante

$$\tau_{\psi} = \frac{1}{\omega} \tan \psi$$

où ω est égal à $2\pi\nu$, ν , étant la fréquence de modulation de la lumière.

CHAPITRE IV

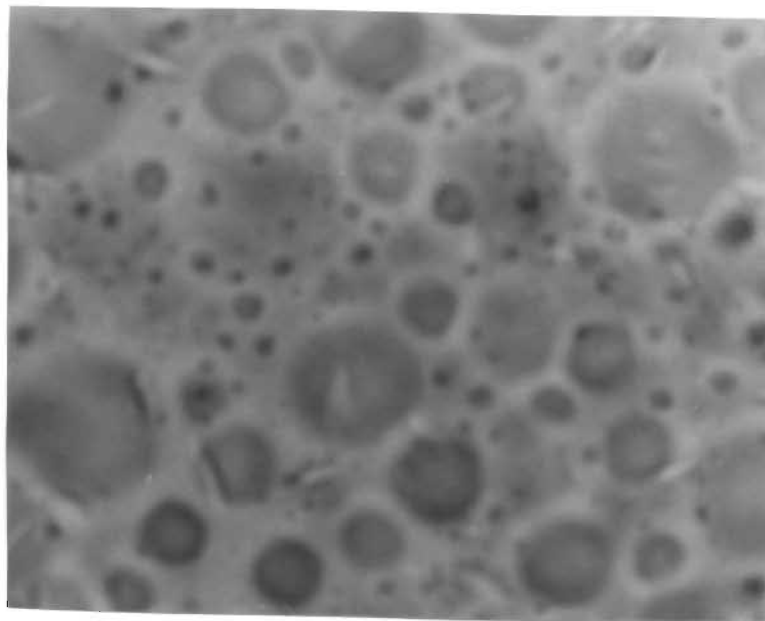
RÉSULTATS ET DISCUSSION

A) Photographies des échantillons

La figure 13 présente des photographies de chloroplastes (pl) en milieux isotrope (fig. 13A) et anisotrope (fig. 13B). Nous notons que la préparation du milieu anisotropique a bien favorisé une orientation des chloroplastes par rapport à l'axe d'étirement, mais nous pouvons aussi noter une déformation de ces chloroplastes. De forme sphérique en milieu isotrope, les chloroplastes passent à une forme ellipsoïdale dans un milieu anisotrope. Nous retrouvons le même genre de déformation pour les thylacoïdes de la préparation 1 (fig. 14) et pour les échantillons de la préparation 2 (résultats non présentés) incorporés dans un film étiré (300%) d'alcool de polyvinyle.

Étant donnée la méthode d'orientation utilisée, la forme sphérique et la taille des chloroplastes et des thylacoïdes extraits jouent un rôle important dans leur déformation. En travaillant avec des structures de formes ellipsoïdales ou plus petites, p. ex. les photosystèmes I et II, nous pourrions éliminer ou réduire le facteur de déformation, tout en conservant une orientation du matériel biologique.

A)



B)

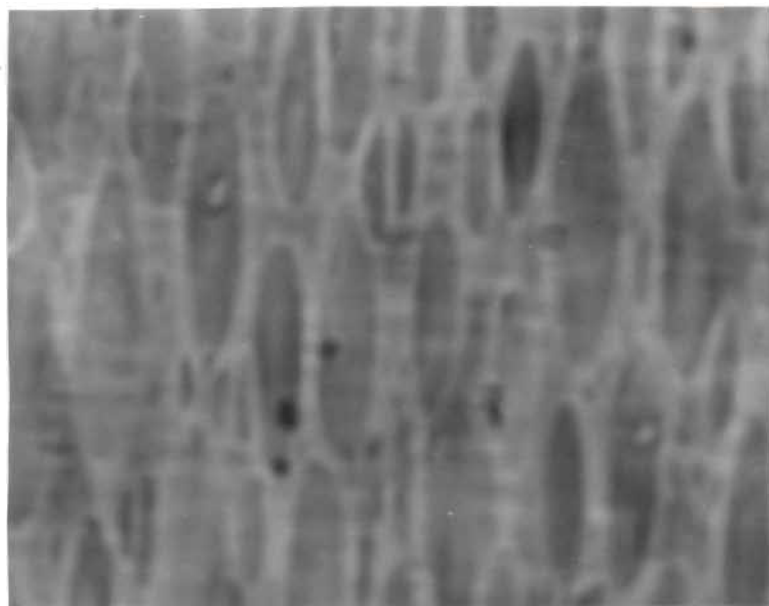


Figure 13. Photographies de chloroplastes incorporés dans des films d'alcool de polyvinyle non-étiré (0%) (A) et étiré (300%) (B) (grossissement 400X).

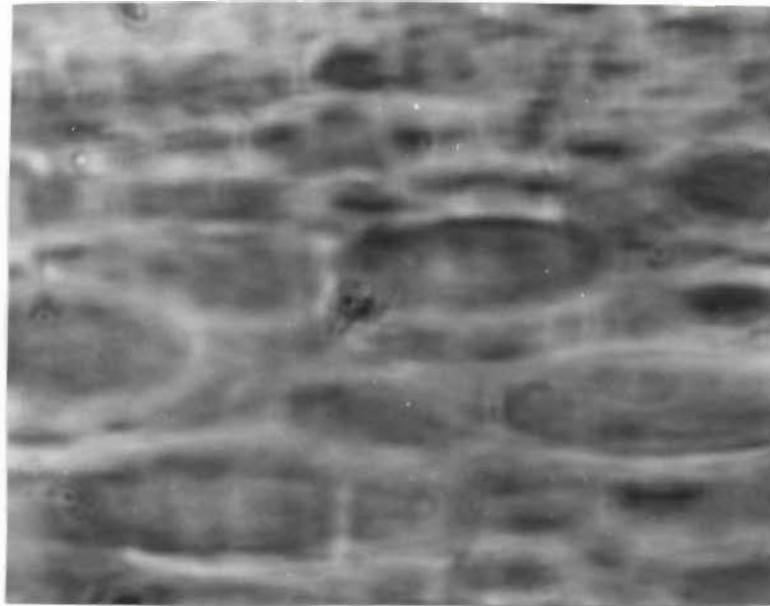


Figure 14. Photographie de thylacoïdes incorporés dans un film étiré d'alcool de polyvinyle (300%). (grossissement 400X).

En considérant l'état de déformation de nos échantillons de chloroplastes et de thylacoïdes, il serait bon d'orienter ces échantillons à l'aide d'une autre méthode, par exemple celle du pinceau (Penna et al., 1975). Il serait intéressant de comparer les résultats obtenus à partir des méthodes d'orientation des échantillons biologiques.

Les figures 13 et 14 montrent clairement l'état de pureté des échantillons de la première méthode d'extraction. Pour les échantillons de la deuxième méthode d'extraction, il existe une plus grande homogénéité des préparations (résultats non montrés). Dans l'avenir, il serait souhaitable d'utiliser la méthode de Reeves et Hall (1980) pour extraire les chloroplastes et les thylacoïdes.

B) Relation entre la déformation mécanique et l'anisotropie optique des échantillons

Au tableau 2, nous donnons les valeurs de l'anisotropie optique (Δ), de la déformation mécanique (D) et du facteur de l'efficacité de l'orientation (Δ/D). L'anisotropie optique est calculée à partir du rapport de l'absorbance du faisceau analytique polarisé parallèlement à celle du faisceau polarisé perpendiculairement pour les films d'alcool de polyvinyle avant et après étirement. L'anisotropie optique est calculée en se servant de l'équation (4). Les valeurs nous sont données pour les chloroplastes et les thylacoïdes préparés suivant les deux

Tableau 2

Valeurs de l'anisotropie optique (Δ), de la déformation mécanique (D) et leur rapport (Δ/D) pour les chloroplastes, les thylacoïdes et le Rouge de Congo incorporés dans des films d'alcool de polyvinyle, où les indices b et a représentent respectivement avant et après l'étirement.

Échantillon	$A_{ }^b / A_{\perp}^b$	$A_{ }^a / A_{\perp}^a$	Δ	D	Δ/D
Rouge de Congo (c = 5×10^{-5} M)	1,000	5,250	2,291	5,78	0,396
Chloroplaste entier (p2)	1,000	1,022	1,011	3,00	0,337
Chloroplaste brisé (p2)	1,027	1,179	1,071	3,00	0,357
Thylacoïde (p2)	0,930	1,183	1,128	3,00	0,376
Chloroplaste (p1)	0,996	1,197	1,096	4,35	0,252
Thylacoïde (p1)	0,980	1,331	1,165	2,15	0,547

méthodes d'extraction et de purification ainsi que pour le Rouge de Congo incorporé dans un film d'alcool de polyvinyle. Dans le cas du Rouge de Congo, les valeurs sont tirées de Frackowiak et al. (1986b).

Les observations expérimentales pour le Rouge de Congo servent à comparer l'effet de l'orientation dans le cas d'un pigment libre par rapport aux pigments attachés à une membrane (p. ex. chlorophylles et caroténoïdes). Pour calculer le facteur de déformation (D) du Rouge de Congo, nous ne nous servons pas de ses dimension comme dans le cas des chloroplastes et des thylacoïdes, mais plutôt des dimensions du film d'alcool de polyvinyle. Ainsi, nous déterminons les valeurs de h et de v à partir des longueurs du film dans le sens de l'étirement (h) et dans le sens perpendiculaire à celui-ci (v) (voir fig. 15).

Si nous comparons les valeurs de l'anisotropie optique (Δ) dans le cas d'un pigment libre, tel que le Rouge de Congo, et de pigments attachés à une membrane, tels les chlorophylles et les caroténoïdes, nous pouvons voir que pour les chloroplastes et les thylacoïdes la valeur de Δ est égale à $1,1 \pm 0,1$, tandis que pour le Rouge de Congo, le Δ est d'environ 2,3. Une valeur deux fois plus petite dans le cas des chloroplastes et des thylacoïdes comparativement au Rouge de Congo nous indique qu'il existe des interactions spécifiques entre les pigments et leur environnement membranaire. Ces interactions limitent la liberté de mouvement des pigments ce qui implique qu'à un même pourcentage d'étirement, l'anisotropie des pigments membranaires est moins importante que celle des pigments libres.

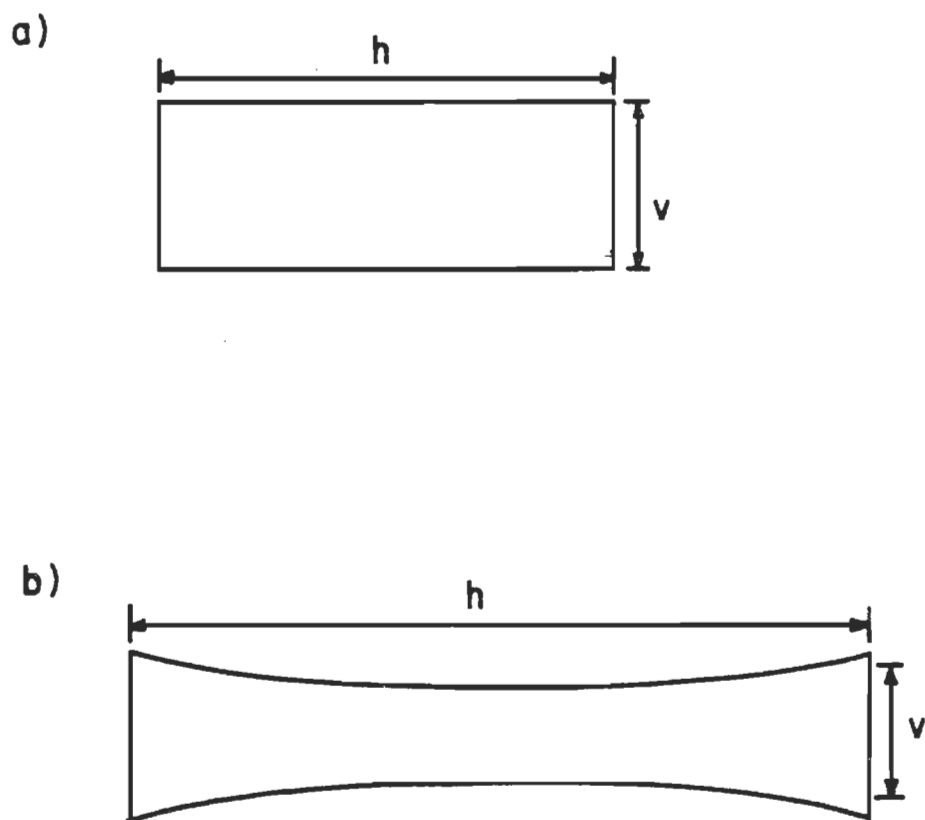


Figure 15. Schémas du film de Rouge de Congo avant (a) et après (b) étirement. h représente la longueur dans le sens de l'axe d'étirement et v la longueur de l'axe perpendiculairement à l'étirement.

Les valeurs de l'efficacité d'orientation (Δ/D), varient en fonction des échantillons. Les valeurs de Δ/D des chloroplastes et des thylacoïdes de la deuxième extraction sont du même ordre de grandeur que celle du Rouge de Congo. Par contre, pour les chloroplastes et les thylacoïdes de la préparation 1, les valeurs de Δ/D sont respectivement plus petit et plus grand que pour les échantillons de la préparation 2. La différence entre les valeurs d'efficacité d'orientation des échantillons provient principalement du facteur de déformation mécanique qui varie d'un échantillon à l'autre.

Trois facteurs peuvent causer l'anisotropie des échantillons biologiques dans les films d'alcool de polyvinyle: (i) un alignement des membranes par rapport à l'axe d'élongation du film; (ii) une déformation des structures biologiques incorporées dans le film; (iii) une réorientation des pigments dans la membrane. D'après Biggins et Svejksky (1980), les spectres de dichroïsme linéaire de thylacoïdes incorporés dans des films d'alcool de polyvinyle sont dus principalement à l'alignement des membranes dans l'axe d'étirement du film, mais ils ne soulignent pas la possibilité d'une déformation des structures. A partir du facteur de déformation mécanique et des photographies des échantillons, nous concluons qu'il existe une déformation des structures, et que cette déformation doit être responsable en partie de l'anisotropie d'absorption.

Afin de connaître dans quelle proportion la déformation mécanique et la réorientation des pigments sont responsables de l'anisotropie d'absorption, il faudrait faire une étude des facteurs d'anisotropie optique et de déformation mécanique à différents pourcentages d'étirement. Ce projet de recherche permettrait d'obtenir des renseignements supplémentaires sur les mécanismes responsables de l'anisotropie d'absorption pour des structures biologiques incorporées dans des films d'alcool de polyvinyle.

Nous pouvons conclure que les différences observées entre les pigments libres (Rouge de Congo), les chloroplastes et les thylacoïdes incorporés dans les films d'alcool de polyvinyle sont dues aux propriétés mécaniques différentes entre un film d'alcool de polyvinyle et une membrane biologique. Une partie du dichroïsme linéaire observé chez les échantillons, est due à la déformation des chloroplastes et des thylacoïdes.

C) Propriétés spectroscopiques en lumière polarisée

a) Absorption

Les spectres d'absorption des chloroplastes et des thylacoïdes des deux préparations incorporés dans un milieu isotrope varient peu en fonction de la polarisation de la lumière incidente. A la

figure 16, nous présentons un exemple de spectres d'absorption pris en lumière naturelle et en lumière polarisée pour les chloroplastes de la préparation 1. Nous pouvons voir qu'il existe peu de différence entre les spectres d'absorption.

Nous tenons à souligner que les spectres d'absorption ont été enregistrés lorsqu'une petite partie de l'échantillon était illuminée. Par conséquent, il était très difficile d'éclairer toujours le même endroit de l'échantillon. Et les différences observées entre les spectres d'absorption polarisée pourraient être reliées à une fluctuation du nombre de chloroplastes et de thylacoïdes présents dans la zone éclairée. Nous pouvons donc considérer que les films non-étirés forment un milieu isotrope.

A la figure 17, nous montrons les spectres d'absorption pour les chloroplastes (A) et les thylacoïdes (B) incorporés dans des films d'alcool de polyvinyle non-étirés pour les préparations 1 (p1) et 2 (p2). Nous remarquons que les spectres d'absorption des deux préparations ne sont pas identiques. Nous notons que les maximums d'absorption des spectres des échantillons de la préparation 2 sont déplacés d'environ six nanomètres vers le rouge par rapport aux échantillons de la préparation 1.

Arntzen et Briantais (1975) ont montré que les conditions de culture des plantes telles que l'intensité lumineuse, la durée

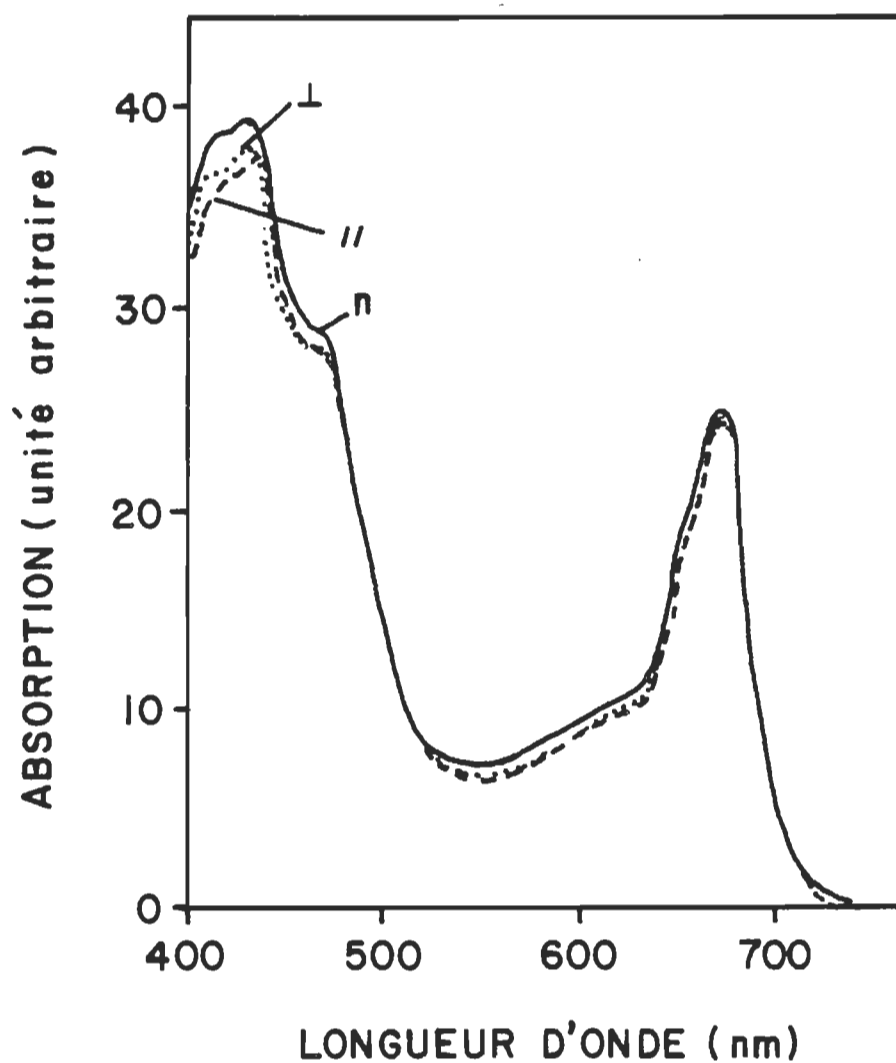


Figure 16. Spectres d'absorption de chloroplastes de la préparation 1 dans un film non-étiré, pris en lumière naturelle (n), polarisée parallèlement (//) ou perpendiculairement (⊥) à l'échantillon.

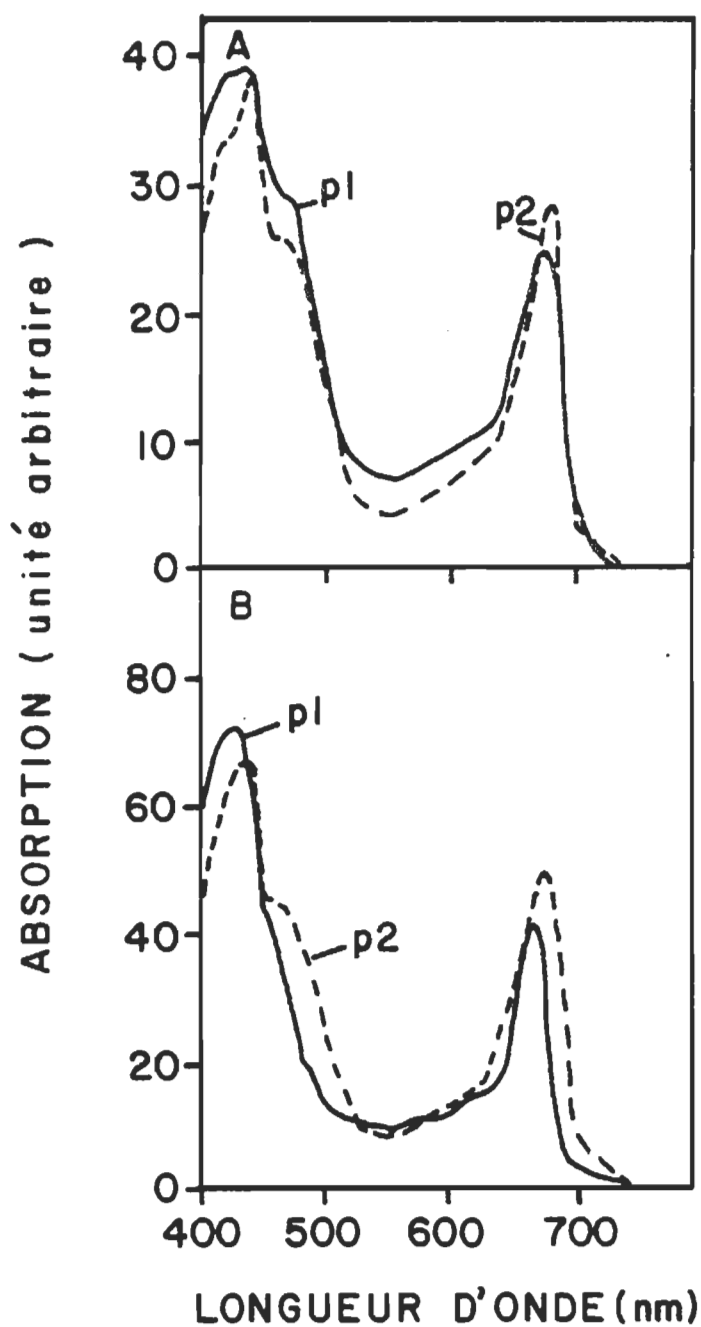


Figure 17. Spectres d'absorption de chloroplastes (A) et de thylacoïdes (B) dans des films isotropes (0%), pour les échantillons des préparations 1 (p1) et 2 (p2).

d'illumination, la présence d'ion, etc., influencent la structure des chloroplastes chez plusieurs espèces de plantes. Et de plus, il existe une grande variété morphologique des chloroplastes chez les plantes (Douce and Joyard, 1984). Les chloroplastes et les thylacoïdes des deux préparations proviennent de deux espèces de plantes qui ont poussé dans des conditions de cultures différentes. Ce développement particulier explique les différences dans les spectres d'absorption des deux préparations.

Les spectres d'absorption des chloroplastes (A) et des thylacoïdes (B) incorporés dans un milieu anisotrope pris en lumière polarisée parallèlement (\parallel) ou perpendiculairement (\perp) à l'échantillon sont donnés à la figure 18. Nous notons que les spectres pris en lumière polarisée parallèlement absorbent plus intensément que les spectres obtenus à partir de la lumière polarisée perpendiculairement.

Au tableau 3, nous donnons les valeurs de dichroïsme linéaire (DL) calculées pour les deux maximums des spectres d'absorption des chloroplastes et des thylacoïdes des deux préparations. Le ΔA se calcule à partir de la différence entre l'absorption parallèle et l'absorption perpendiculaire tandis que le DL est égal à $A_{\parallel} - A_{\perp} / A_{\parallel} + 2A_{\perp}$.

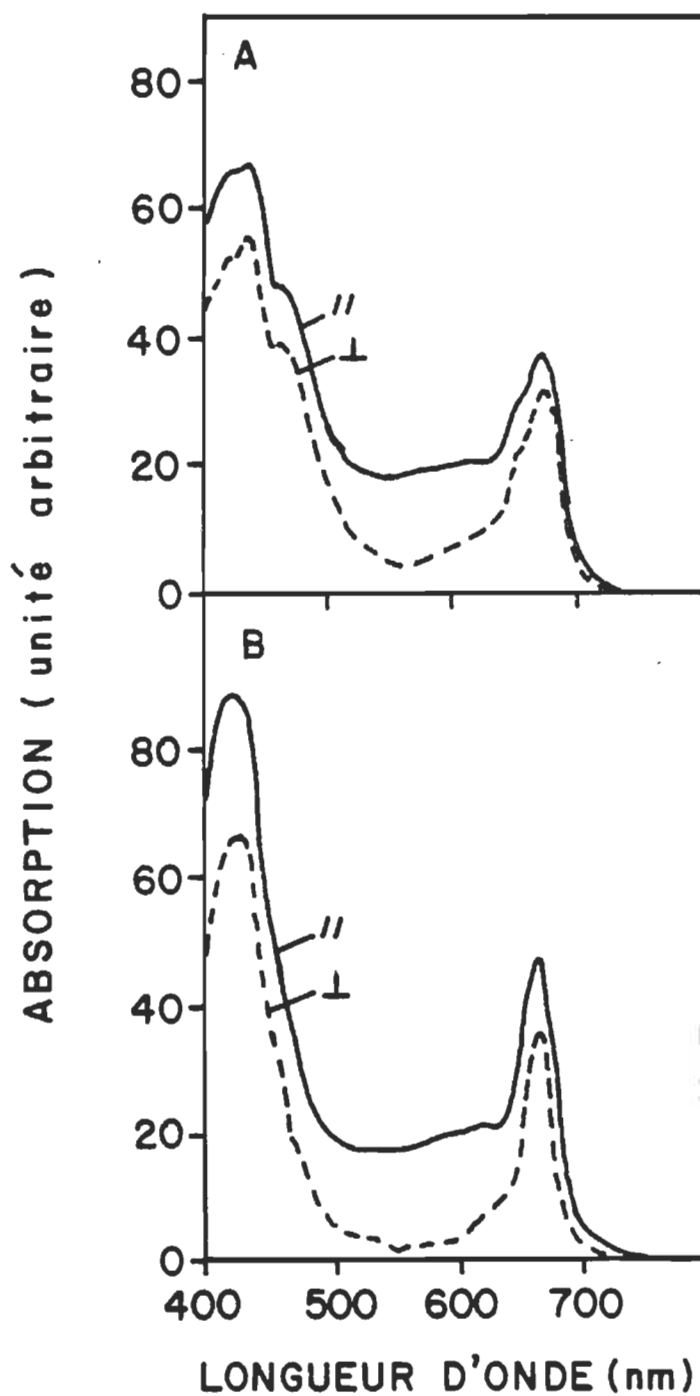


Figure 18. Spectres d'absorption de chloroplastes (A) et de thylacoïdes (B) de la préparation 1, dans des films anisotropes (300%), en lumière polarisée parallèlement (//) ou perpendiculairement (⊥) à l'échantillon.

Tableau 3

Valeurs du dichroïsme linéaire (DL) pour les chloroplastes
et les thylacoïdes.

Échantillon	Préparation	λ (nm)	ΔA ($A_{ } - A_{\perp}$)	DL $\frac{(A_{ } - A_{\perp})}{(A_{ } + 2A_{\perp})}$
Chloroplaste	1	670	6,13	0,061
		432	12,09	0,067
Thylacoïde	1	664	11,67	0,101
		424	22,50	0,101
Chloroplaste entier	2	675	5,94	0,028
		435	7,19	0,022
Chloroplaste brisé	2	676	2,15	0,044
		435	4,02	0,055
Thylacoïde	2	675	4,20	0,060
		436	4,00	0,040

Nous connaissons l'attribution des différentes bandes d'absorption des chloroplastes et des thylacoïdes (Drapier and Dubacq, 1984 et Kramer and Amesz, 1982). Les différentes bandes ont été attribuées à des pigments (Paillotin and Breton, 1977) ou à des complexes chlorophylle-protéine (Tapie et al., 1982). Nous savons aussi que la bande d'absorption dans le rouge est due principalement à la transition $S_0 \rightarrow S_1$ (état fondamental \rightarrow premier état excité) du moment de transition QY de la chlorophylle-a. Dans le cas de la chlorophylle-a dissoute dans une solution d'éther éthylique, le maximum d'absorption de la transition QY se situe à 662 nm (French, 1971). La valeur du maximum varie donc en fonction du solvant ou de son environnement. De plus, l'orientation des pigments dans un échantillon influencera l'intensité d'absorption des moments de transition des molécules suivant la nature de la polarisation de la lumière absorbée.

En connaissant la position des moments de transition des molécules, on peut obtenir des indices sur l'orientation des molécules par rapport aux échantillons à partir des valeurs de dichroïsme linéaire. Comme nous connaissons la position des moments de transition X et Y de la chlorophylle-a et en considérant l'orientation de la chlorophylle-a selon un axe située le long du moment de transition Y (Frackowiak et al., 1983b), la valeur de DL est supérieure pour le maximum de la bande rouge comparativement au maximum

d'absorption de la bande de Soret, comme dans le cas des chloroplastes entiers et des thylacoïdes de la préparation 2 (voir Tableau 3).

Mais pour des valeurs de DL identique pour les deux maximums d'absorption, comme c'est le cas pour les chloroplastes et les thylacoïdes de la préparation 1, nous pouvons donner deux explications. Premièrement, l'axe d'orientation de la chlorophylle-a serait localisé entre les deux moments de transition X et Y. Deuxièmement, un des moments de transition de la chlorophylle-a serait hors du plan de la membrane. Mais nous savons (Breton and Vermeiglio, 1982), que la transition X de la chlorophylle-a est positionné hors du plan de la membrane, donc la deuxième interprétation serait la plus réaliste.

En se basant sur les spectres d'absorption et les valeurs de dichroïsme linéaire, nous pouvons conclure que (i) la différence entre les spectres d'absorption parallèle et perpendiculaire des chloroplastes et des thylacoïdes dans des films d'alcool de polyvinyle non-étiré, est due aux conditions expérimentales employées dans les méthodes de préparation; (ii) nous formons une anisotropie d'absorption en étirant les films d'alcool de polyvinyle; (iii) les chlorophylles-a seraient orientées dans la membrane des thylacoïdes avec le moment de transition X placé hors du plan de la membrane.

b) Excitation

Nous avons pris des spectres d'excitation de fluorescence pour les chloroplastes et les thylacoïdes de la préparation 1 incorporés dans les films d'alcool de polyvinyle, à quatre longueurs d'onde, soit 674, 700, 730 et 750 nm. La polarisation de la lumière à l'excitation variait de l'horizontale (H) à la verticale (V) par rapport à l'échantillon. Par contre, au faisceau d'émission, nous observons toujours la lumière polarisée horizontalement (H) par rapport à l'échantillon. Nous plaçons le sens de l'étirement du film d'alcool de polyvinyle selon un axe horizontal, et ce pour tous les spectres.

A la figure 19, nous présentons les spectres d'excitation de fluorescence à 674 nm pour les chloroplastes et les thylacoïdes en milieu isotrope et anisotrope en lumière polarisée horizontalement aux faisceaux d'excitation et d'émission. Nous pouvons voir que pour une même structure, les spectres d'excitation de fluorescence varient avec le degré d'anisotropie du milieu. De plus, nous notons une absorption dans la région des caroténoïdes, qui dans le cas des thylacoïdes en milieu anisotrope, devient aussi importante que l'absorption des chlorophylles dans la bande de Soret.

Si nous comparons la forme des thylacoïdes par rapport à celle des chloroplastes, nous nous rendons compte que les thylacoïdes

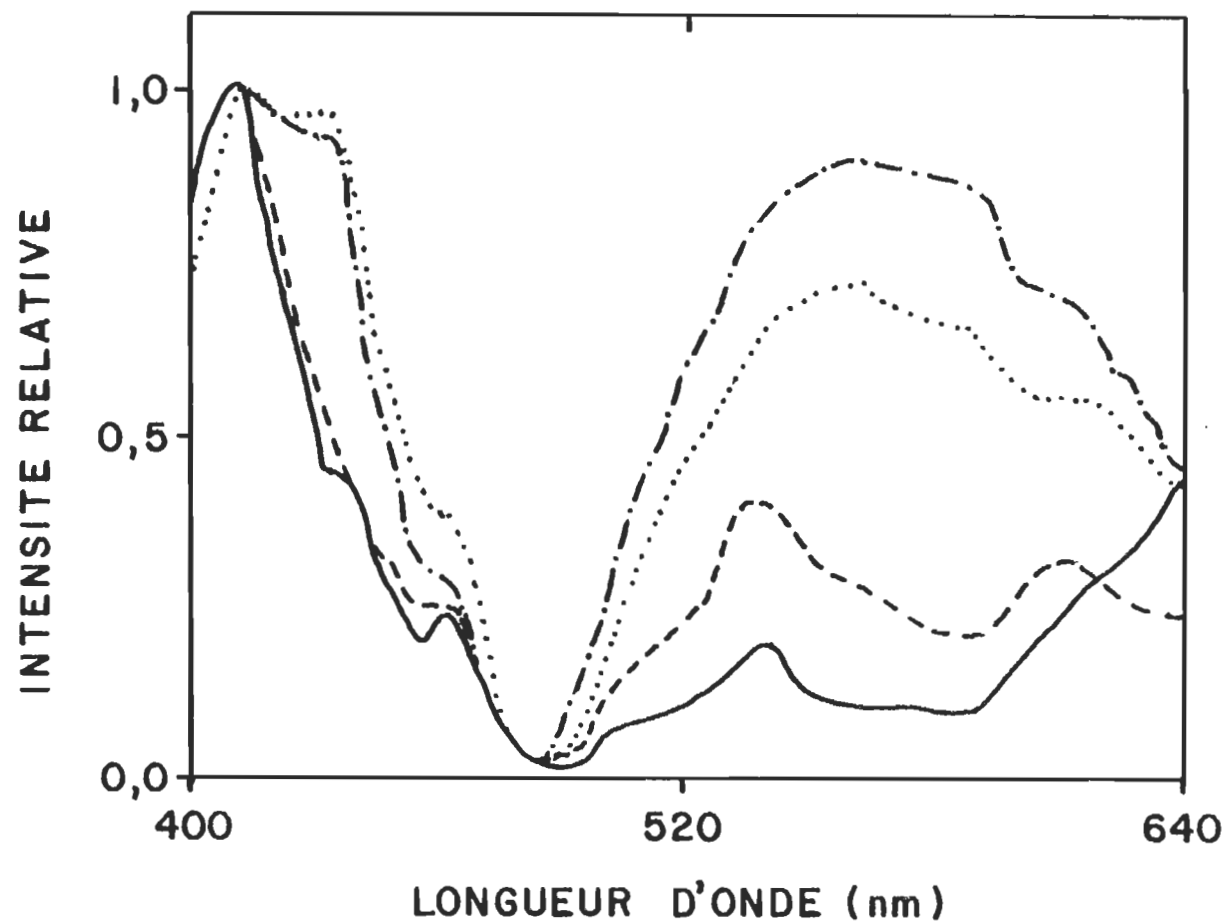


Figure 19. Spectres d'excitation de fluorescence de chloroplastes 0% (—) et 300% (---) et de thylacoïdes 0% (.....) et 300% (-.-.-) incorporés dans des films d'alcool de polyvinyle ($\lambda_{\text{émis}} = 674 \text{ nm}$).

sont plus plats. Donc, lors de leur incorporation dans le film d'alcool de polyvinyle, les thylacoïdes auront tendance à être situés majoritairement dans le plan du film comparativement aux chloroplastes. On doit se rappeler que lorsque nous étirons le film d'alcool de polyvinyle, nous favorisons l'orientation des chloroplastes et des thylacoïdes dans le plan du film.

Nous savons que les pigments photosynthétiques sont situés principalement dans la membrane des thylacoïdes. En augmentant l'orientation des chloroplastes et des thylacoïdes dans le plan du film, nous favorisons l'orientation de la membrane des thylacoïdes dans ce même plan. Et comme nous notons que l'absorption des caroténoïdes augmente lorsqu'il y a une plus grande orientation des chloroplastes et des thylacoïdes dans le plan du film, les caroténoïdes seraient orientées parallèlement au plan de la membrane des thylacoïdes.

La figure 20 montre les spectres d'excitation de fluorescence à 700 nm pour les thylacoïdes de la préparation 1 incorporés dans un film d'alcool de polyvinyle non-étiré et étiré. On note que les spectres d'excitation se ressemblent, mais les thylacoïdes en milieu anisotrope ont une plus grande absorption.

Nous savons qu'en étirant les films d'alcool de polyvinyle, nous favorisons l'orientation des thylacoïdes dans le plan du film.

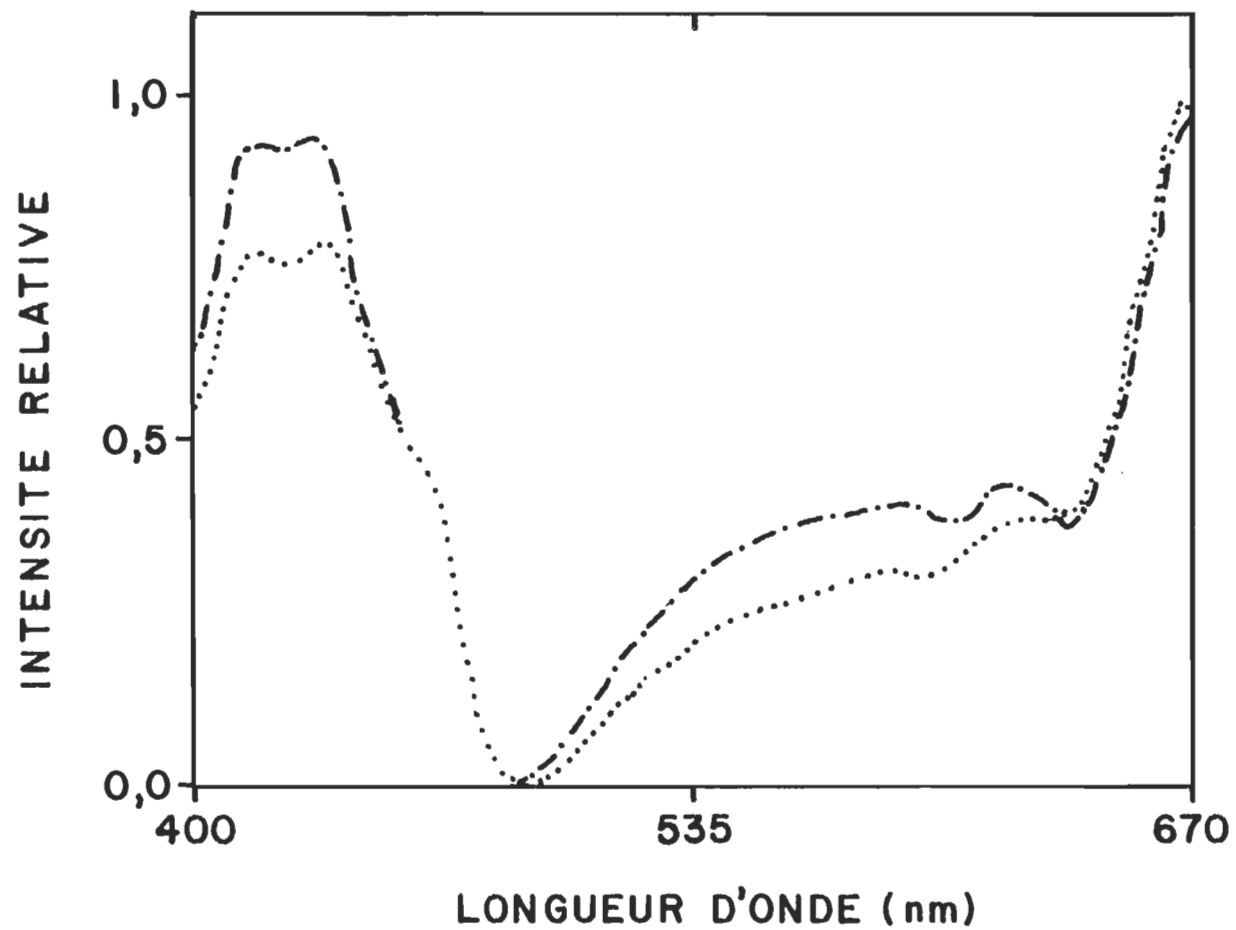


Figure 20. Spectres d'excitation de fluorescence de thylacoïdes 0% (.....) et 300 % (-.-.-) incorporés dans des films d'alcool de polyvinyle ($\lambda_{\text{émis}} = 700 \text{ nm}$).

Donc pour avoir une plus grande absorption en milieu anisotrope, les composants émettant dans la région de 700 nm, doivent être orientés dans le plan de la membrane. Nous savons que la bande de fluorescence à 700 nm provient de deux composantes, soit F685 et F695 (Weiss, 1985a) qui sont toutes deux reliées au photosystème II. En se basant sur les résultats de Nabadryk et al. (1984), les deux composantes (F685 et F695) seraient orientées dans le plan de la membrane ce qui est en accord avec nos résultats.

Aux figures 21 et 22, nous avons les spectres d'excitation de fluorescence à 730 et 750 nm respectivement. Ces spectres ont été pris pour les chloroplastes et les thylacoïdes de la préparation 1 en milieu isotrope et anisotrope. La fluorescence à 730 et 750 nm provient du photosystème I (Papageorgious, 1975). Nous pouvons voir aux figures 21 et 22, qu'il existe une absorption de la chlorophylle-b, pour tous les échantillons. Pour les thylacoïdes, nous observons un épaulement dans la région où la chlorophylle-b absorbe tandis que chez les chloroplastes, nous notons une résolution de la bande.

D'après Breton et Vermeglio (1982), le moment de transition Y de la chlorophylle-b serait dirigé hors du plan de la membrane. Similairement à la chlorophylle-a, l'absorption de la chlorophylle-b dans la bande de Soret est due au moment de transition Y. Étant donné que les thylacoïdes se situent majoritairement dans le

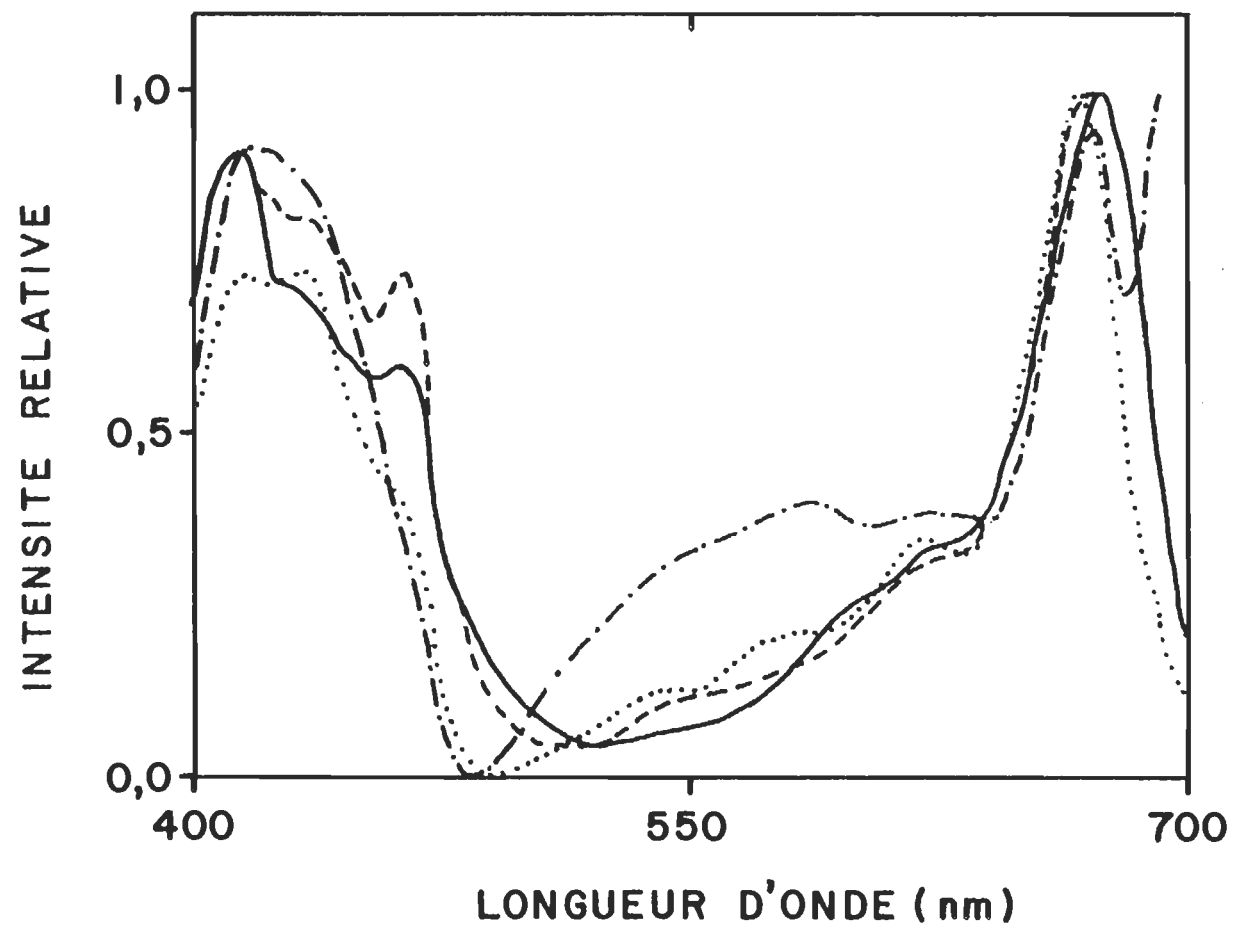


Figure 21. Spectres d'excitation de fluorescence de chloroplastes 0% (—) et 300% (---) et de thylacoïdes 0% (.....) et 300% (-.-.-) incorporés dans des films d'alcool de polyvinyle ($\lambda_{\text{émis}} = 730 \text{ nm}$).

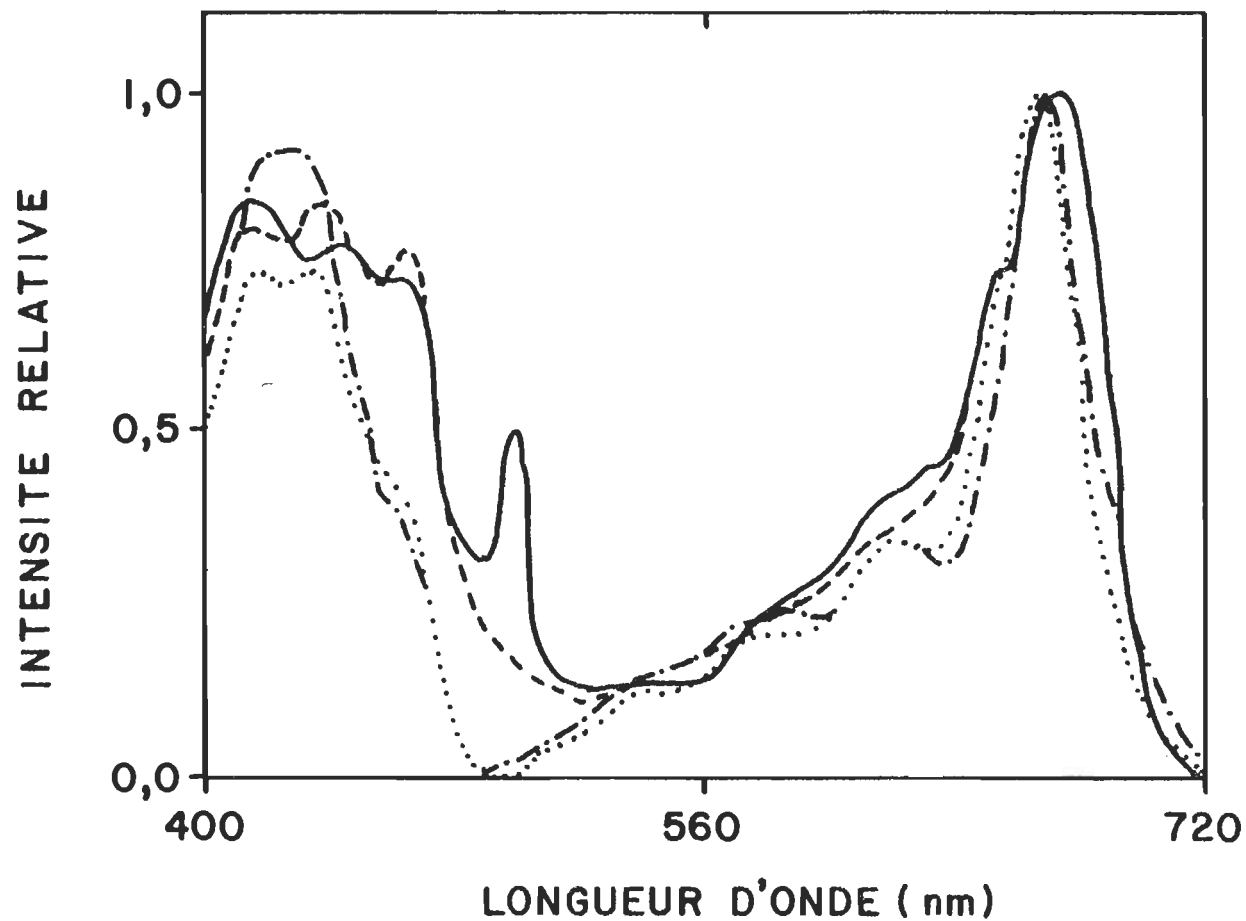


Figure 22. Spectres d'excitation de fluorescence de chloroplastes 0% (—) et 300% (----) et de thylacoïdes 0% (.....) et 300% (-.-.-) incorporés dans des films d'alcool de polyvinyle ($\lambda_{\text{émis}} = 750 \text{ nm}$).

plan du film d'alcool de polyvinyle comparativement aux chloroplastes, il est normal que la présence d'un moment de transition situé hors du plan nous permet d'observer une absorption moins importante.

En examinant les figures de 19 à 22, nous voyons que tous les spectres d'excitation de fluorescence sont normalisés à leur maximum, mais l'intensité des spectres varient d'un échantillon à l'autre. Pour cette raison, nous présentons au tableau 4, les valeurs de l'intensité du spectre d'excitation à différentes longueurs d'onde (420, 464, 540 et 670 nm) pour les chloroplastes et les thylacoïdes de la préparation 1 en milieux isotrope et anisotrope. Nous avons varié deux facteurs, premièrement la longueur d'onde à l'émission (674, 700, 730 et 750 nm) et deuxièmement, la polarisation de la lumière (HH et VH). Les largeurs des fentes indiquées au tableau 4 sont différentes suivant les échantillons.

En examinant le tableau 4, nous nous rendons compte que l'intensité des spectres aux différentes longueurs d'onde varient en fonction du milieu isotropique ou anisotropique, de la polarisation des faisceaux lumineux et de la longueur d'onde à l'émission. Ces différences s'observent plus facilement pour les spectres d'excitation au niveau de deux régions, soit celle de la bande de Soret de la chlorophylle-b et celle des caroténoïdes, car dans ces

Tableau 4

Valeurs de l'intensité relative des spectres d'excitation de fluorescence pour différents maximums.

Échantillon	Étirement	Fente (mm)	λ à l'émission (nm)	Intensité relative							
				420		464		540		670	
				HH	VH	HH	VH	HH	VH	HH	VH
Chloroplaste	0%	2,0	674	0,64	1,12	0,28	0,48	0,25	0,45	--	--
Chloroplaste	300%	2,5	674	1,56	2,11	0,68	1,08	0,90	1,47	--	--
Thylacofide	0%	2,0	674	4,84	8,07	2,41	4,21	3,49	7,98	--	--
Thylacofide	300%	1,5	674	1,64	2,55	0,67	1,14	1,40	2,63	--	--
Thylacofide	0%	2,0	700	5,75	9,26	3,90	6,37	2,34	4,69	7,24	8,48
Thylacofide	300%	1,5	700	1,47	2,10	0,79	1,22	0,65	1,05	1,55	1,50
Chloroplaste	0%	2,0	730	0,83	1,29	0,64	1,05	0,26	0,40	0,93	1,10
Chloroplaste	300%	2,5	730	1,17	1,64	1,04	1,63	0,42	0,60	1,32	1,27
Thylacofide	0%	2,0	730	5,91	9,23	3,81	6,14	1,69	2,91	7,77	9,17
Thylacofide	300%	1,5	730	1,41	2,11	0,75	1,21	0,63	1,05	1,48	1,45
Chloroplaste	0%	2,0	750	0,76	1,23	0,70	1,07	0,24	0,39	0,89	1,01
Chloroplaste	300%	2,5	750	1,30	1,61	1,29	1,62	0,45	0,58	1,39	1,27
Thylacofide	0%	2,0	750	5,98	9,15	3,76	5,99	1,74	2,88	7,70	8,98
Thylacofide	300%	1,5	750	0,84	1,22	0,41	0,63	0,21	0,32	0,92	0,89

régions, il n'existe pas de superposition avec d'autre bande d'absorption.

Ainsi, les valeurs de l'intensité (F) des spectres d'excitation pour les caroténoïdes (540 nm) montrent que $F_{VH} > F_{HH}$ ce qui indique que les caroténoïdes seraient orientés parallèlement à la direction du moment de transition QX de la chlorophylle-a absorbant dans la région de 420 nm. De plus le tableau 4 présente des mesures d'intensités $F_{VH} > F_{HH}$, sauf à 670 nm, pour les chloroplastes et les thylacoïdes en milieu anisotrope. Ce résultat signifie que l'étirement du film d'alcool de polyvinyle joue un rôle important pour l'orientation des molécules dans la membrane des thylacoïdes.

c) Émission

Tous les spectres d'émission polarisée furent obtenus dans les mêmes conditions expérimentales. Nous excitions les échantillons à 420 nm. Lors de la prise des spectres, la lecture se faisait à tous les deux nanomètres durant une période de deux secondes. En fonction des échantillons examinés, nous devions varier la largeur des fentes. Le tableau 5 donne les intensités relatives de fluorescence des chloroplastes et des thylacoïdes.

Les films d'alcool de polyvinyle étaient placés sur le porte-échantillon de façon à ce que l'axe d'étirement du film soit

Tableau 5

Intensité de fluorescence des chloroplastes et des thylacoïdes
de la préparation 1 à différents maximums.

Échantillon	Fente (mm)	Polarisation	Intensité (unité arbitraire)			
			λ (nm)			
			674	700	730	750
Chloroplaste 0%	2,0	HH	2,65	1,10	0,50	0,70
	2,0	HV	0,96	0,62	0,86	0,68
	2,0	VV	0,61	0,51	0,94	0,81
	2,0	VH	1,78	0,81	0,49	0,74
Chloroplaste 300%	2,5	HH	2,28	1,31	0,72	0,98
	2,5	HV	1,36	1,15	1,44	1,04
	2,5	VV	1,15	1,18	1,92	1,36
	2,5	VH	1,59	1,19	0,92	1,18
Thylacoïde 0%	2,0	HH	1,25	1,49	1,23	1,81
	2,0	HV	0,84	1,65	2,74	1,85
	2,0	VV	1,18	2,26	3,79	2,56
	2,0	VH	1,40	1,80	1,73	2,30
Thylacoïde 300%	1,5	HH	19,92	5,76	1,86	2,00
	1,5	HV	13,80	5,76	3,87	2,23
	1,5	VV	11,26	5,05	4,06	2,48
	1,5	VH	17,70	5,42	1,75	2,12

horizontal (voir figure 10). La polarisation de la lumière se faisait à l'aide de polariseurs situés aux faisceaux d'excitation et d'émission, nous pouvions ainsi polariser la lumière horizontalement ou verticalement à l'échantillon.

Le choix de la longueur d'onde d'excitation est important. D'après Michel-Villaz (1976), nous devons choisir une longueur d'onde d'excitation correspondant à un moment de transition connu afin d'être à même de comprendre les phénomènes observés (p. ex. transfert d'énergie, fluorescence, etc.).

Différents auteurs (Sato and Butler, 1978 et Kramer and Amesz, 1982) prennent les spectres de fluorescence en excitant dans la région de 660 nm afin de voir directement la fluorescence des molécules excitées, sans qu'il ne se produise d'autres phénomènes de désactivation et/ou de transfert d'énergie.

Par contre, d'autres auteurs (Geacintov et al., 1974 et Weiss, 1985b) préfèrent exciter au niveau de la bande de Soret afin d'inclure le processus de transfert d'énergie intermoléculaire. C'est une des raisons pour laquelle nous avons choisi d'exciter à 420 nm. Une autre raison motivant le choix de 420 nm est l'existence d'une superposition des moments de transition X et Y de la chlorophylle-a. Comme ces moments de transition sont orientés différemment dans la membrane, en changeant la polarisation du faisceau

d'excitation, nous pouvons observer des phénomènes différents. C'est le principe de la photosélection.

A la figure 23, nous montrons les spectres d'émission polarisée (HH), des thylacoïdes incorporés dans un film d'alcool de polyvinyle non-étiré pour deux préparations différentes. Nous notons que le spectre des thylacoïdes de la préparation 1 présente trois maximums situés à 674, 700 et 750 nm tandis que les thylacoïdes extraits en employant la préparation 2 ont une bande principale à 680 nm avec un épaulement à 730 nm. En changeant la polarisation de la lumière, nous notons que la forme et l'intensité de l'épaulement varie, mais il n'y a pas de résolution d'un second pic (résultats inédits).

Lorsque nous comparons les spectres d'émission polarisée des chloroplastes et des thylacoïdes obtenus par les deux méthodes de préparations à ceux publiés (Papageorgious, 1975), nous nous rendons compte que les spectres des échantillons de la préparation 1 sont semblables aux spectres d'émission obtenus à basse température tandis que ceux de la préparation 2 ressemblent aux spectres d'émission pris à température ambiante. Nous tenons à souligner que nos spectres d'émission polarisée des chloroplastes et des thylacoïdes des deux préparations ont été pris dans les mêmes conditions expérimentales, soit à température ambiante.

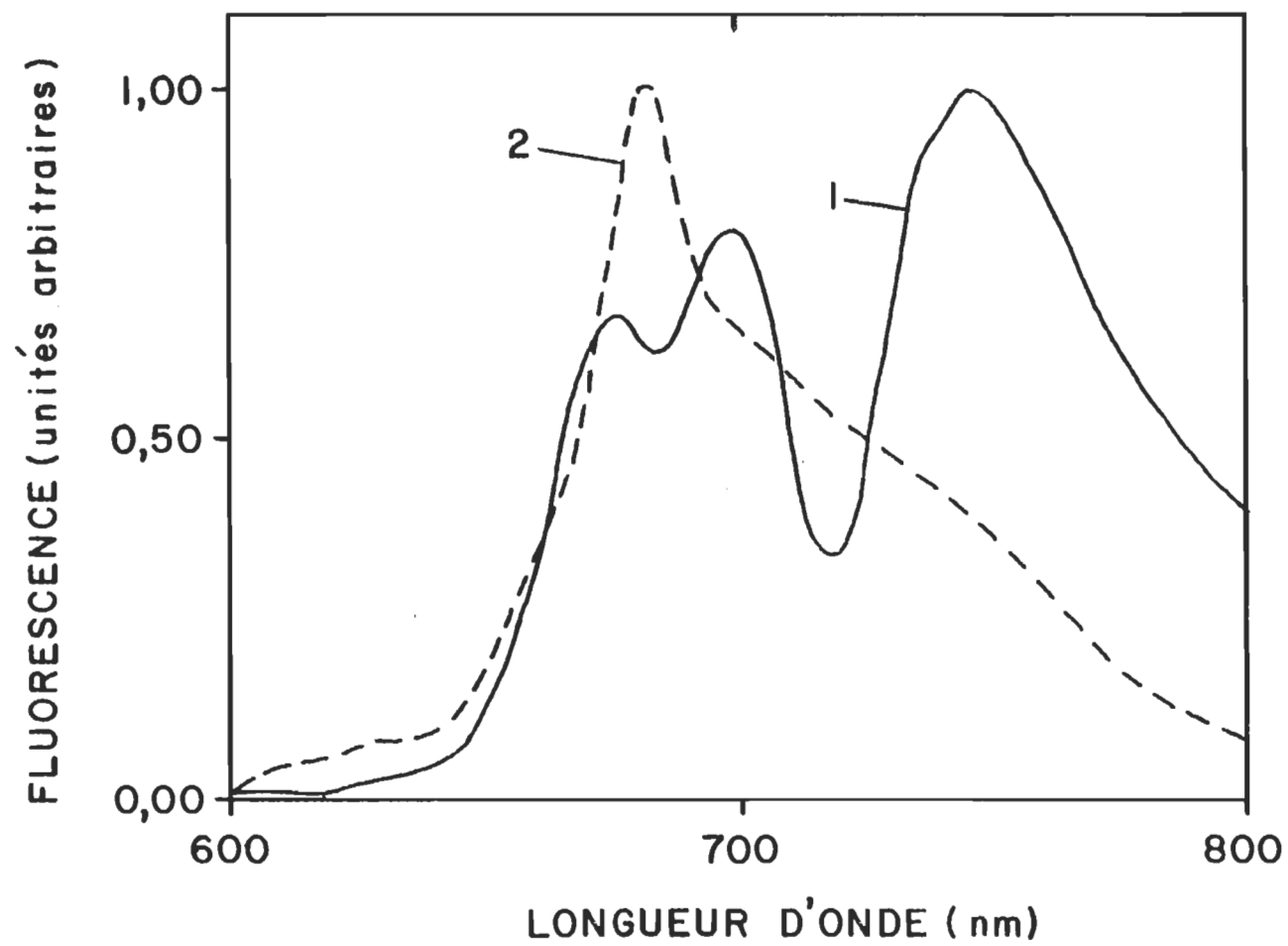


Figure 23. Spectres de fluorescence de thylacoïdes des préparations 1 (—) et 2 (-----).

A la figure 24, nous présentons les spectres d'émission polarisée pour les chloroplastes (A) et les thylacoïdes (B) de la préparation 1, en milieu isotrope. Nous remarquons que le spectre d'émission des chloroplastes est formé de deux bandes principales. Le maximum de la première bande se situe à 674 nm. Et le maximum de la deuxième bande varie en fonction de la polarisation de la lumière du faisceau d'émission. Ainsi, la valeur du maximum se situe respectivement à 730 et 750 nm suivant une polarisation verticale ou horizontale.

Les différences que nous observons entre les spectres d'émission pour les composantes de polarisation des chloroplastes et des thylacoïdes incorporés en milieu isotrope sont dues à la photosélection. Les différences observées nous montre que tous les moments de transition ne prennent pas part de la même façon dans le processus de transfert d'énergie.

Si nous comparons les spectres d'émission des thylacoïdes à ceux des chloroplastes, nous nous rendons compte que la bande d'émission des chloroplastes à 674 nm se divise chez les thylacoïdes pour donner deux maximums situés à 670 et 700 nm. Bien que la forme des bandes des spectres d'émission polarisée soit semblable pour les chloroplastes et les thylacoïdes, nous notons au tableau 5 que l'intensité de fluorescence varie.

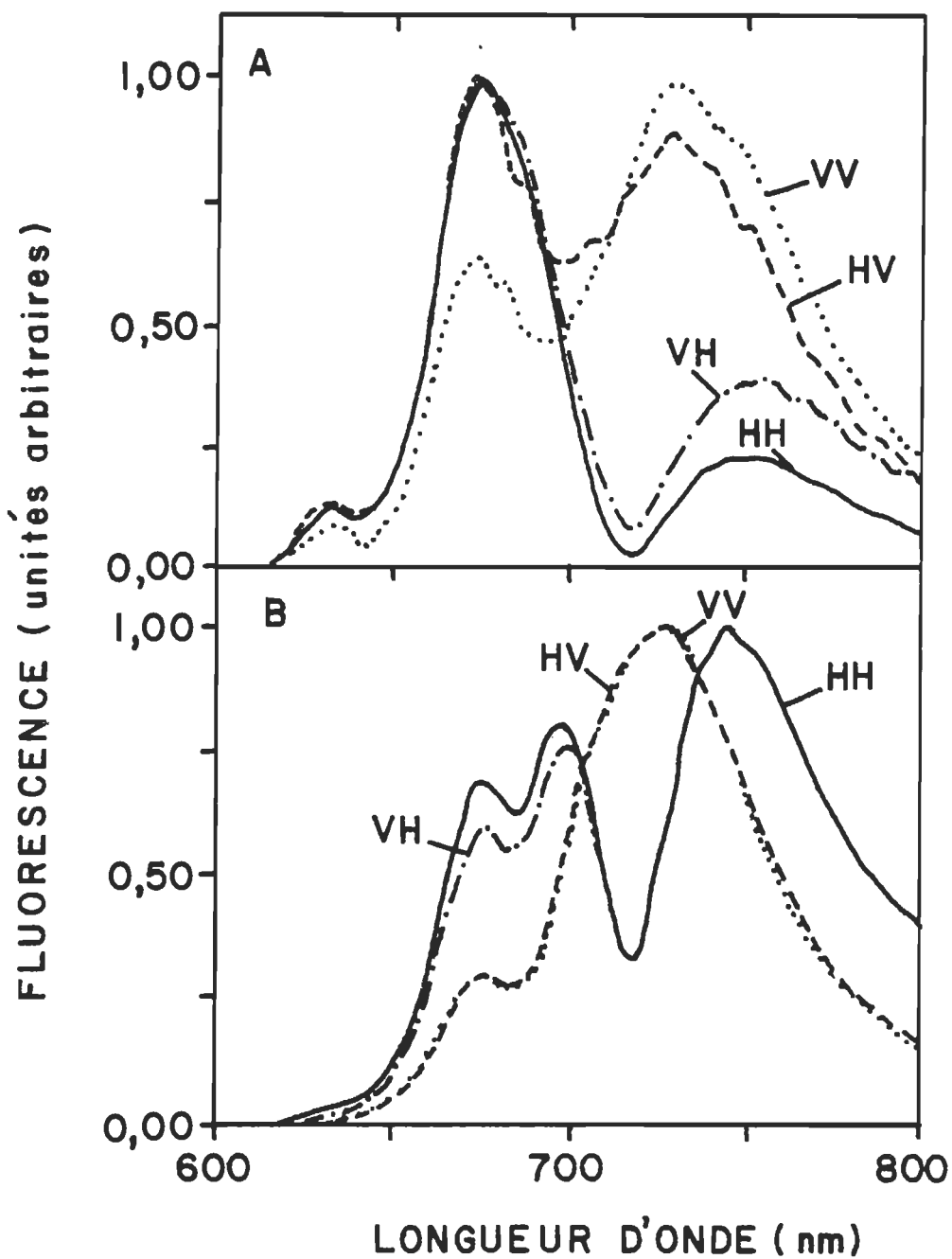


Figure 24. Spectres de fluorescence de chloroplastes (A) et de thylacoïdes (B) de la préparation 1 dans des films isotropes ($\lambda_{\text{exc}} = 420 \text{ nm}$). H et V signifient respectivement la polarisation horizontale et verticale aux faisceaux d'excitation et d'émission.

La figure 25 montre les spectres d'émission polarisée des chloroplastes (A) et des thylacoïdes (B) en milieu anisotrope. Si nous comparons ces spectres à ceux obtenus en milieu isotrope, nous pouvons voir que pour les chloroplastes, le maximum à 674 nm se divise en deux composantes lorsqu'ils sont en milieu anisotrope, les maximums se situent à 674 et 680 nm. Ces maximums varient en fonction de la polarisation de la lumière. Les spectres d'émission des thylacoïdes changent de façon plus marqués. En milieu anisotrope, le spectre d'émission se compose d'une bande ($\lambda_{\text{max}} = 674 \text{ nm}$) ainsi que d'un épaulement dans la région de 730 ou 750 nm dont la longueur d'onde d'émission varie en fonction de la polarisation de la lumière du faisceau d'émission. En plus du changement dans la forme du spectre, nous pouvons voir au tableau 5 qu'il existe un facteur de 10 entre l'intensité de fluorescence à 674 nm pour les thylacoïdes en milieu isotrope par rapport à celle en milieu anisotrope.

Nous retrouvons quatre bandes principales pour les spectres d'émission polarisée des chloroplastes et des thylacoïdes. Les longueurs d'onde maximums se situent à 674, 700, 730 et 750 nm (F674, F700, F730 et F750).

A F674, nous pouvons relier différentes composantes photosynthétiques qui émettent dans cette région. Il y a une contribution de F680 qui provient des antennes collectrices et qui absorbent aux

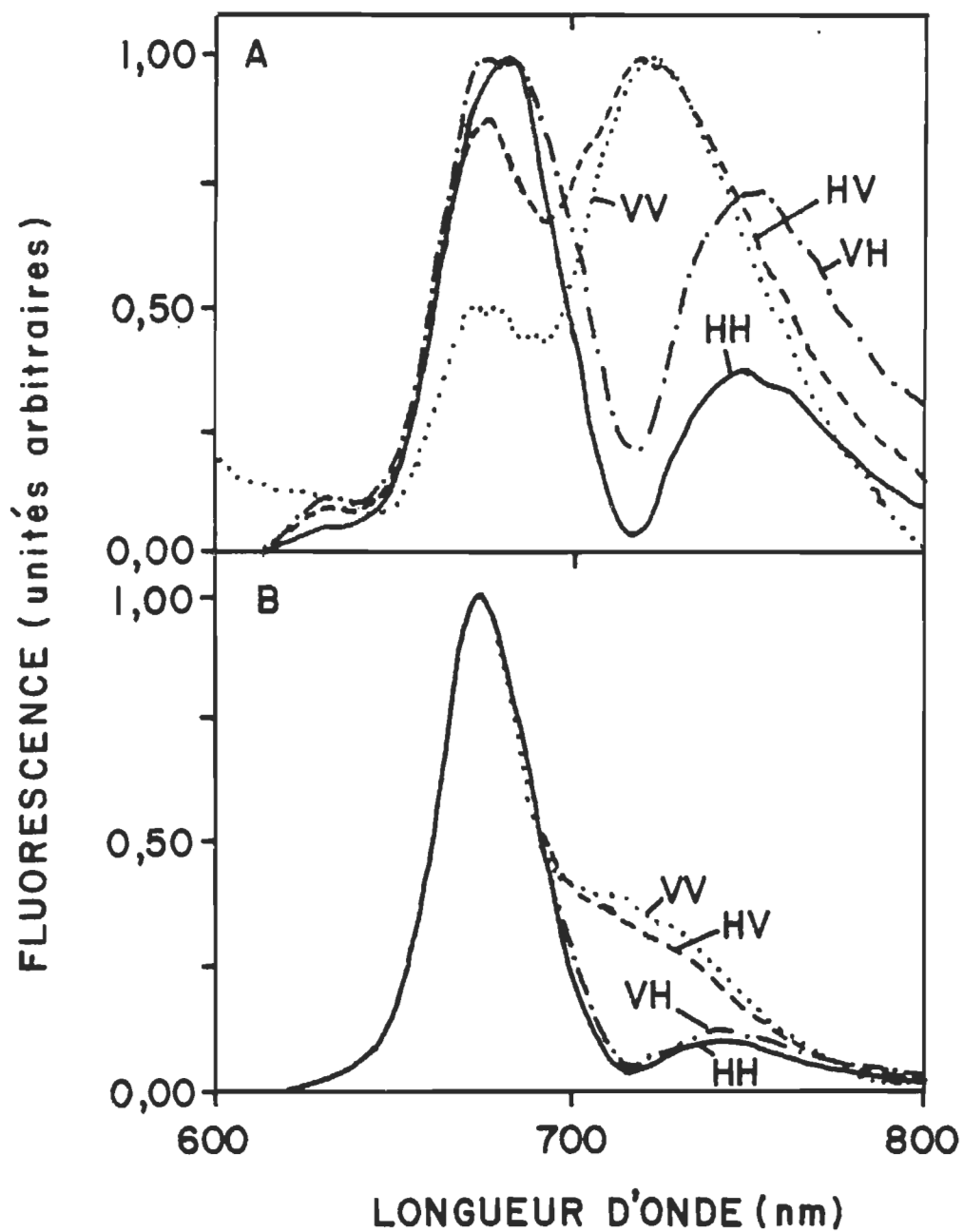


Figure 25. Spectres de fluorescence de chloroplastes (A) et de thylacoïdes (B) de la préparation 1 dans des films anisotropes ($\lambda_{\text{exc}} = 420 \text{ nm}$). H et V signifient respectivement la polarisation horizontale et verticale aux faisceaux d'excitation et d'émission.

environs de 670 nm (Bose, 1982). Une deuxième composante qui contribuerait à F674 serait celle de F665 qui est due à la chlorophylle-b (Papageorgious, 1975). Et nous observons probablement aussi la fluorescence d'une chlorophylle-a absorbant dans la région de 660 nm qui peut émettre dans les films d'alcool de polyvinyle (Frackowiak, et al., 1983a).

A F700, il y aurait contribution de deux composantes, F685 et F695. La composante F685 provient en grande partie du complexe du coeur du photosystème II tandis que F695 est assignée au centre réactionnel du photosystème II (Bose, 1982). Les deux bandes F730 et F750 proviennent de la chlorophylle-a du photosystème I (Govindjee and Govindjee, 1975).

Nous pouvons relier la variation des bandes à 730 et 750 nm à la polarisation de la lumière au faisceau d'émission et au phénomène de photosélection. Nous savons que ces deux bandes sont attribuées au photosystème I (Govindjee and Govindjee, 1975). En polarisant la lumière verticalement par rapport à l'axe d'étirement du film au faisceau d'émission, nous favorisons l'observation de l'émission des moments de transition orientés parallèlement à la direction de la lumière polarisée du faisceau lumineux, c'est-à-dire les moments de transition orientés perpendiculairement à l'axe d'étirement du film. Et en polarisant la lumière horizontalement, nous observons préférentiellement les moments de transition orientés parallèlement à l'axe d'étirement du film. Ainsi, les

chlorophylles-a du photosystème I émettant à 730 et 750 nm sont orientées respectivement parallèlement et perpendiculairement à l'axe d'étirement du film.

Le tableau 6 donne le rapport F_{HH}/F_{VH} pour les chloroplastes et les thylacoïdes de la préparation 1. On voit que la valeur à 674 et 700 nm, en particulier dans le cas des films anisotropes, est supérieure à celle calculée à 730 et 750 nm. Cette observation signifie que les moments de transition des molécules émettant à 674 et 700 nm forment des angles plus petit avec les moments de transition de la chlorophylle-a absorbant à 420 nm comparativement à ceux des molécules émettant à 730 et 750 nm.

Nous avons vu au tableau 5 que les thylacoïdes en milieu anisotrope ont une grande intensité de fluorescence à 674 nm (PSII) par rapport à l'intensité à 730 et 750 nm (PSI). Ce phénomène peut être interprété par une diminution du transfert d'énergie entre les deux photosystèmes.

En se basant sur nos données expérimentales, nous pouvons conclure que la polarisation de la lumière et le degré d'anisotropie du film d'alcool de polyvinyle amènent des changements marqués dans l'intensité relative des différentes bandes d'émission. Toutes les différences observées nous laissent croire que lors de l'étirement du film d'alcool de polyvinyle, il y a un changement dans

Tableau 6

Valeurs du rapport de l'intensité d'émission (F_{HH}/F_{VH}) à différents maximums pour les chloroplastes et les thylacoïdes de la préparation 1.

Échantillons	F_{HH}/F_{VH}			
	674	700	730	750
Chloroplaste				
0%	2,76	1,77	0,58	1,03
300%	1,68	1,14	0,50	0,94
Thylacoïde				
0%	1,49	0,90	0,45	0,98
300%	1,44	1,00	0,48	0,90

l'orientation de certains chromophores, ce qui influence le transfert d'énergie entre les pigments ou les photosystèmes. Par le fait même, il existe des changements dans le rapport entre l'intensité des maximums d'émission, en particulier le rapport F730/F700 qui est assigné au phénomène d'adaptation à l'intensité lumineuse (Sato and Fork, 1983 et Saito et al., 1983).

d) Photoacoustique

L'étude en spectroscopie photoacoustique d'échantillon orienté est relativement récente (Frackowiak et al., 1985, 1986a et b). Cette méthode permet d'étudier la désactivation thermique de chromophores orientés.

Les figures 26 et 27 donnent les spectres photoacoustiques pris en lumière naturelle (n) et en lumière polarisée (\parallel et \perp) de chloroplastes (figure 26) et de thylacoïdes (figure 27) en milieu isotrope ou anisotrope. Nous notons peu de différence entre les spectres pris en lumière polarisée parallèlement et perpendiculairement.

En examinant l'intensité relative des spectres en milieux isotrope et anisotrope, nous pouvons voir que l'intensité relative des spectres photoacoustiques pris en milieu anisotrope est supérieure à celle des spectres en milieu isotrope. Ceci s'explique

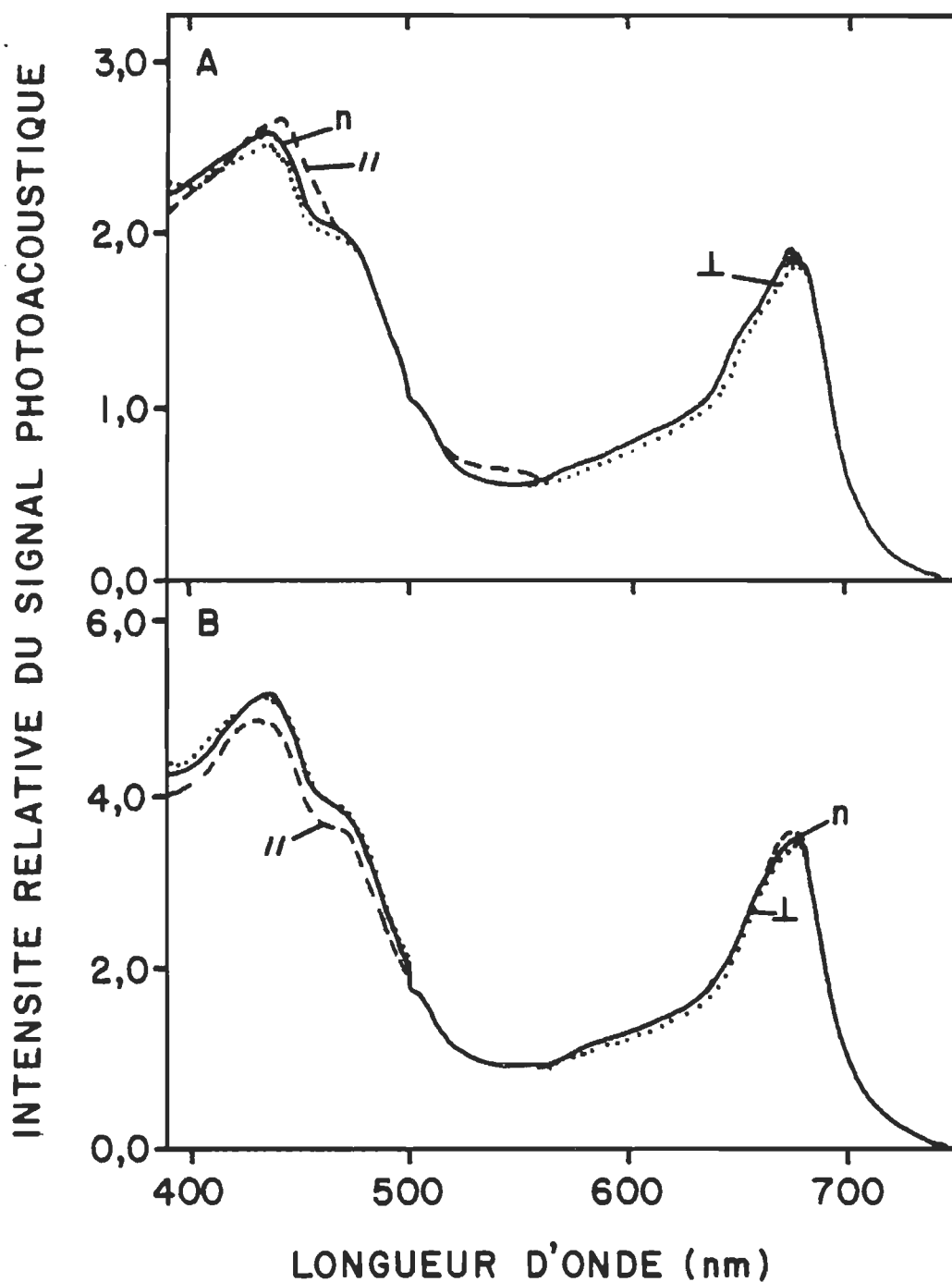


Figure 26. Spectres photoacoustiques de chloroplastes incorporés dans un film isotrope (A) ou anisotrope (B) pris en lumière naturelle (n), polarisée parallèlement (//) ou perpendiculairement (⊥) à l'échantillon.

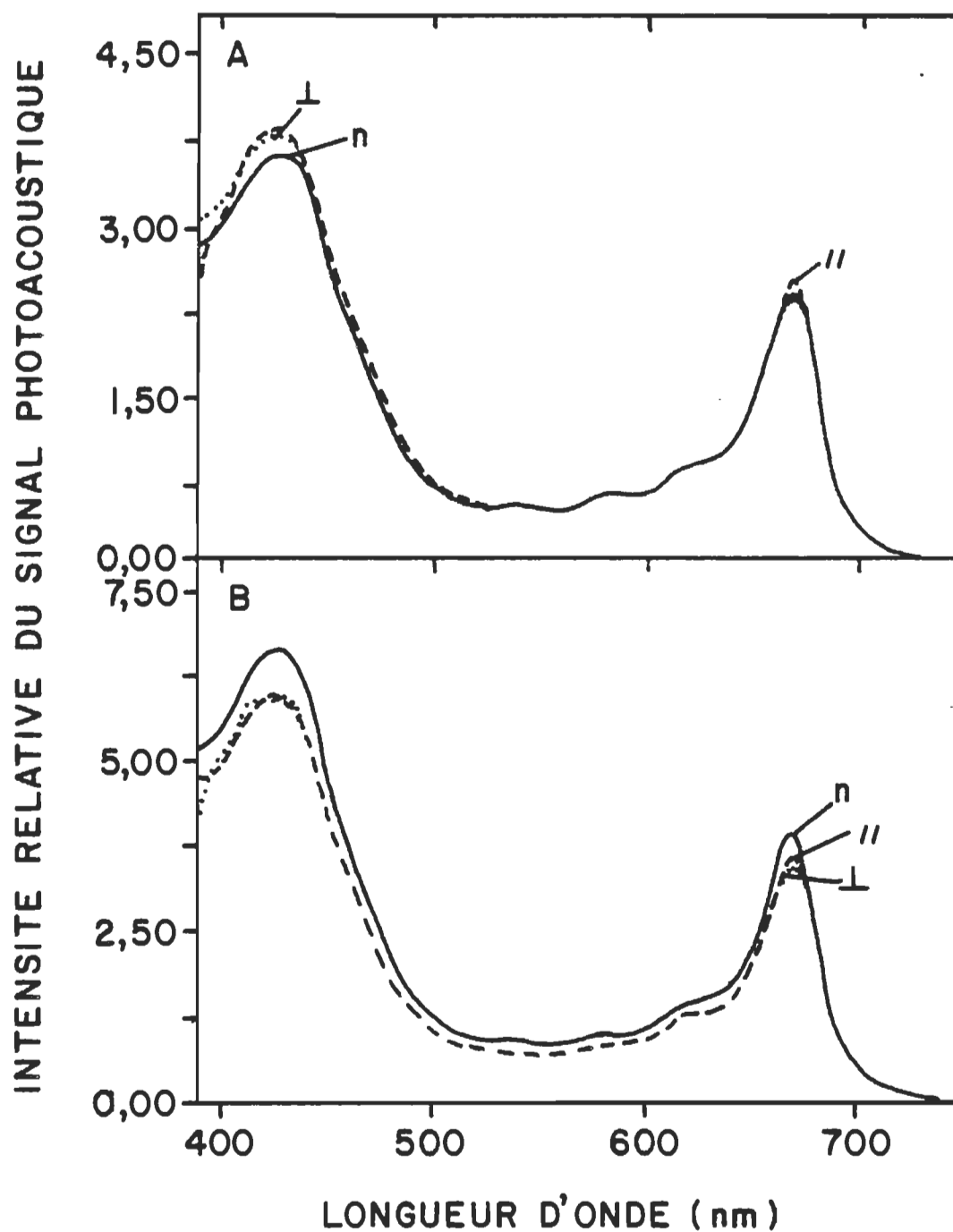


Figure 27. Spectres photoacoustiques de thylacoïdes incorporés dans un film isotrope (A) ou anisotrope (B) pris en lumière naturelle (n), polarisée parallèlement (||) ou perpendiculairement (⊥) à l'échantillon.

par un changement de la conductivité thermique de l'alcool de polyvinyle qui se produit lors de l'étirement du film. Il a été démontré (Frackowiak et al., 1986b) que la conductivité thermique d'un film d'alcool de polyvinyle étiré à 300% est plus grande que pour un film d'alcool de polyvinyle non-étiré 0%. Nous savons que la conductivité thermique de l'échantillon influence l'amplitude du signal photoacoustique (Rosencwaig, 1978). Plus la conductivité thermique d'un échantillon est grande, plus l'intensité du signal photoacoustique est important.

Nous notons à la figure 26B que pour les spectres des chloroplastes en milieu anisotrope, au maximum situé à 674 nm, nous observons que l'intensité du spectre pris en lumière polarisée parallèlement est supérieure à celle pris en lumière polarisée perpendiculairement. Par contre, pour le maximum dans la bande de Soret nous observons une inversion au niveau de l'importance des maximums entre les spectres pris en lumière polarisée. A 674 nm, le spectre présente une intensité plus grande lorsque nous employons une lumière polarisée parallèlement tandis qu'à 434 nm l'intensité la plus élevée est celle observée avec la lumière polarisée perpendiculairement. Nous pouvons voir le même phénomène se produire pour les thylacoïdes en milieu anisotrope (figure 27B).

Lorsque nous prenons les spectres d'absorption en lumière polarisée, le spectre d'absorption mesuré en lumière polarisée

parallèlement est toujours supérieur au spectre d'absorption mesuré en lumière polarisée perpendiculairement pour un échantillon orienté parallèlement au faisceau analytique. Mais pour les spectres photoacoustiques, ce n'est pas toujours le cas. Lorsque nous mesurons un spectre photoacoustique, le signal provient de la désactivation lumineuse et/ou du transfert d'énergie. Ainsi, il peut arriver qu'une composante orientée perpendiculairement produira un signal supérieur à une composante orientée parallèlement si la composante perpendiculaire reçoit plus d'énergie que la composante parallèle à la suite du transfert d'énergie entre les molécules.

Pour avoir plus d'information sur les effets responsables de la désactivation thermique pour les composantes polarisées des spectres photoacoustiques d'échantillons incorporés dans des films d'alcool de polyvinyle, nous avons travaillé avec un système modèle, soit un pigment synthétique, la mérocyanine-540 (Frackowiak et al., 1986c). Nous nous sommes rendus compte que différents facteurs peuvent influencer la désactivation thermique. Ainsi, en travaillant à différentes concentrations, les effets observés ne sont pas les mêmes. De plus, les films d'alcool de polyvinyle ne peuvent pas être considérés comme une matrice uniforme. Le film se compose d'une matrice amorphe à l'intérieure de laquelle se retrouve de petits cristaux. Les deux types d'environnement peuvent causer des différences importantes pour des pigments

incorporés dans les films d'alcool de polyvinyle. A cause de ces environnements, nous retrouvons deux types de relation, soit une relation pigment-alcool de polyvinyle et pigment-pigment. Dans les chloroplastes et les thylacoïdes, ces relations se réfèrent à celles de chromophore-protéine et chromophore-chromophore.

En incorporant les chloroplastes et les thylacoïdes dans les films d'alcool de polyvinyle, nous les immobilisons. D'après Thomasset et al. (1983), en immobilisant les thylacoïdes, il existe une plus grande stabilité des fragments servant à la conversion énergétique. Cette stabilité s'observe par une diminution de la valeur du rapport PAS 676/PAS 440. Le rapport de PAS 676/PAS 440 pour les chloroplastes et les thylacoïdes incorporés dans les films d'alcool de polyvinyle non-étirés sont du même ordre de grandeur que ceux de Thomasset et al. (1983). Quant aux chloroplastes et aux thylacoïdes incorporés dans les films étirés, le rapport PAS 676/PAS 440 diminue. Nous aurions donc une plus grande stabilité du processus de conversion énergétique dans le cas des films anisotropes. Thomasset et al. (1983) explique ce phénomène par la stabilisation de l'environnement des unités photosynthétiques. Jeanfils et al. (1986) attribuent les effets de l'immobilisation des thylacoïdes au type de matrice utilisée et des conditions expérimentales inhérentes à la méthode d'immobilisation.

En divisant l'amplitude des spectres photoacoustiques par l'intensité d'absorption optique, nous obtenons un indice sur la désactivation thermique, c'est le sujet dont nous discutons dans la section qui suit.

D) Calculs de la désactivation thermique à partir de composantes gaussiennes des spectres d'absorption et de photoacoustique

A partir des données prises en spectroscopie photoacoustique et en spectroscopie d'absorption, nous pouvons calculer le rendement de la désactivation thermique (DT), en divisant l'amplitude du signal photoacoustique par l'intensité d'absorption optique. Nous effectuons ces calculs pour les spectres pris en lumière naturelle (DT_N), polarisée parallèlement ($DT_{||}$) et polarisée perpendiculairement (DT_{\perp}). Au tableau 7, nous donnons les valeurs de la désactivation thermique pour les échantillons photosynthétiques à différentes longueurs d'onde. Dans le cas des chloroplastes et des thylacoïdes incorporés dans les films non-étirés d'alcool de polyvinyle, les valeurs de désactivation thermique varient peu en fonction de la polarisation de la lumière. Cependant, dans le cas des échantillons de films anisotropes les valeurs de la désactivation thermique obtenues en employant la lumière polarisée perpendiculairement sont toujours supérieures aux valeurs de la désactivation thermique obtenues en lumière polarisée parallèlement. Au niveau de la bande de Soret de la chlorophylle-b (464 nm) et dans la région

Tableau 7

Rapport entre le signal photoacoustique et le coefficient d'absorption à certaines longueurs d'onde pour les échantillons de la préparation 1, en lumière naturelle (η), polarisée parallèlement (||) ou perpendiculairement (\perp).

Échantillons	Polarisation de la lumière	Rapport du signal photoacoustique et du coefficient d'absorption à différentes longueurs d'onde (nm)							
		410	414	420	430	464	500	670	675
Chloroplaste 0%	η	5,87	5,90	6,44	6,50	7,03	7,66	7,95	7,99
		6,22	6,21	6,80	6,94	7,48	8,28	8,32	8,08
	\perp	6,32	6,18	6,54	6,60	7,12	7,60	7,18	7,38
Chloroplaste 300%	η	7,13	7,08	8,10	8,23	8,89	8,98	10,07	10,26
		6,45	6,35	7,14	7,71	7,42	7,38	9,60	9,96
	\perp	8,70	8,49	9,31	9,38	10,15	11,37	10,90	11,34
Thylacoïde 0%	η	4,38	4,40	5,06	5,12	5,64	5,66	6,03	6,47
		4,84	4,79	5,63	5,64	6,76	6,54	6,85	9,68
	\perp	4,87	4,84	5,47	5,54	6,85	6,37	6,37	8,89
Thylacoïde 300%	η	7,14	7,10	8,37	9,06	10,90	9,08	10,21	13,03
		5,71	5,67	6,63	6,86	7,87	5,74	8,36	11,02
	\perp	8,13	7,90	8,91	9,14	14,34	18,83	10,26	14,77

d'absorption des caroténoïdes (500 nm), nous retrouvons une plus grande différence entre les valeurs de désactivation thermique parallèle et perpendiculaire. Nous remarquons que dans la région de la bande de Soret, la chlorophylle-b possède une plus grande désactivation thermique que la chlorophylle-a.

La désactivation thermique élevée que nous retrouvons dans le cas des spectres pris en lumière polarisée perpendiculairement pour les chloroplastes et les thylacoïdes en milieu anisotrope s'explique soit par une plus grande fluorescence de la part des molécules orientées parallèlement, soit par l'effet de l'orientation sur les molécules orientées parallèlement par rapport à celles orientées perpendiculairement, ce qui favoriserait un transfert d'énergie vers un chromophore fluorescent fortement. Nous observons une plus grande désactivation thermique de la chlorophylle-b comparativement à la chlorophylle-a. Ce résultat s'explique par le fait que la chlorophylle-b dans la membrane photosynthétique fluoresce moins fortement que la chlorophylle-a. Elle doit donc perdre l'énergie absorbée sous une autre forme que la fluorescence, c'est-à-dire celle de la désactivation thermique.

Par la suite, nous avons établi les composantes gaussiennes pour les spectres d'absorption et photoacoustique. Pour ce faire, nous nous sommes servis des données de Litvin et Sineshchekov (1975) qui déterminent les composantes pour la bande dans le rouge. Quant à la bande de Soret, nous estimons qu'il existe un déplacement de 240 nm entre les

deux bandes, ce qui signifierait la présence d'un saut énergétique identique pour toutes les composantes. Les composantes gaussiennes ainsi déterminées servent à la fois pour les spectres d'absorption et de photoacoustique.

Nous présentons à la figure 28 les spectres d'absorption (A) et photoacoustique (B) pris en lumière polarisée parallèlement pour les thylacoïdes de la préparation 1. De plus, pour chaque spectre, nous montrons les composantes gaussiennes et la composante résultante. Il est à souligner que nous avons calculé l'aire sous la courbe de chacune des composantes. Nous avons divisé les valeurs calculées de chaque composante du spectre photoacoustique par celle de chaque composante correspondante du spectre d'absorption. Le rapport nous donne les valeurs de désactivation thermique pour les composantes gaussiennes, composantes pouvant être identifiées à différents chromophores. Au tableau 8, nous donnons les valeurs de désactivation thermique polarisée pour les composantes gaussiennes de la bande dans le rouge. Nous notons qu'en milieu isotrope (0%), la plupart des composantes de désactivation thermique parallèle et perpendiculaire sont du même ordre de grandeur, tandis qu'en milieu anisotrope (300%) la désactivation thermique perpendiculaire devient dans la majorité des cas supérieure à la désactivation thermique parallèle. Quant aux thylacoïdes examinés à 693 nm, la désactivation thermique parallèle est plus grande que la désactivation thermique perpendiculaire et ceci pour les deux types de milieu.

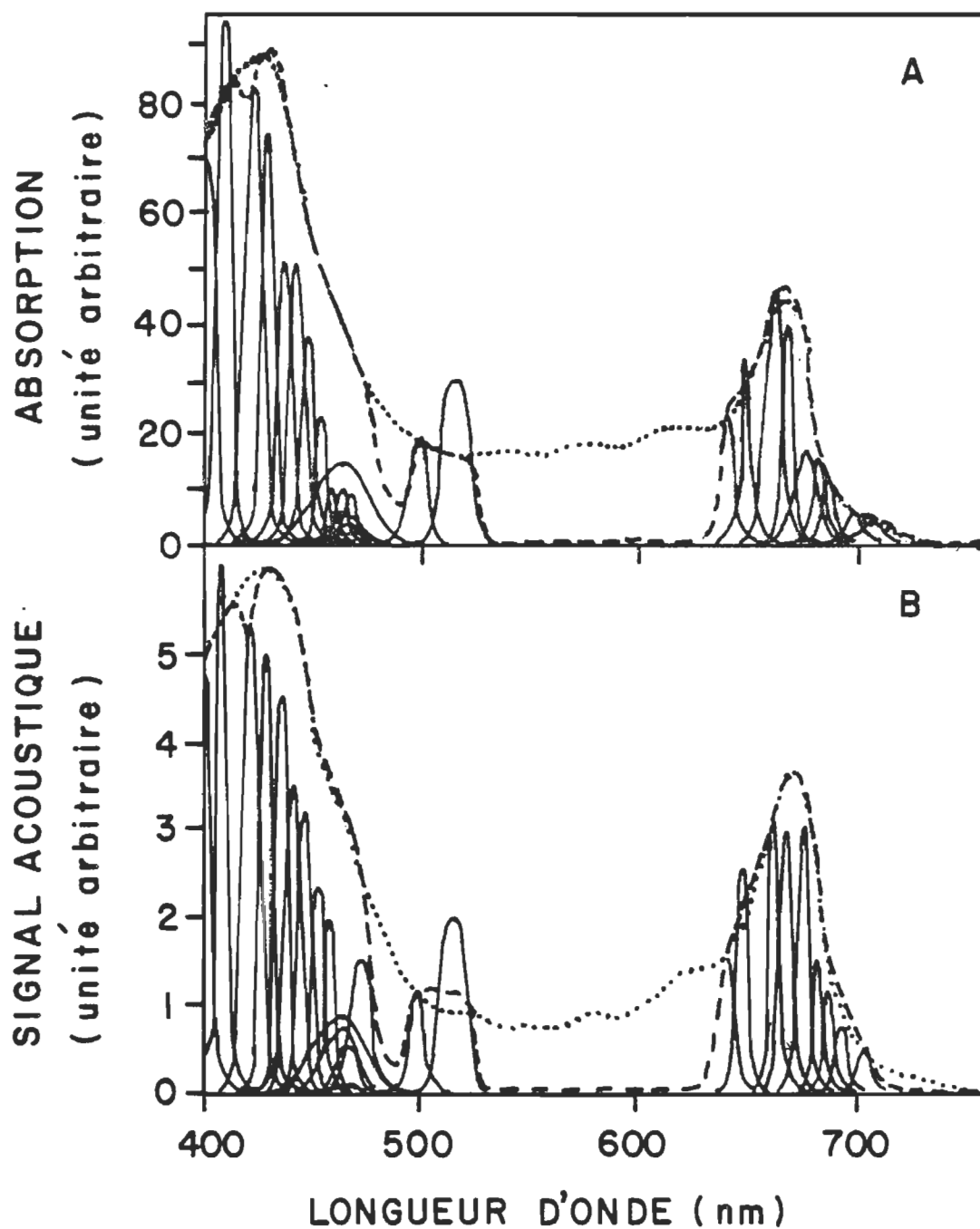


Figure 28. Spectres d'absorption (.....) (A) et de photoacoustique (.....) (B) de thylacoïdes en lumière polarisée parallèlement, ainsi que les composantes gaussiennes (——) des deux bandes principales et leur résultante (-----).

Tableau 8

Valeurs de la désactivation thermique (DT) polarisée de certaines composantes gaussiennes situées dans la région spectrale de 640-693 nm, pour les échantillons de la préparation 1, dans les films non-étiré (0%) et étiré (300%).

Échantillon	Max (nm)	0%		300%	
		DT	DT _⊥	DT	DT _⊥
Chloroplaste	640	0,091	0,087	0,076	0,142
	648	0,082	0,077	0,112	0,111
	662	0,089	0,094	0,084	0,108
	668	0,076	0,067	0,100	0,106
	676	0,071	0,074	0,074	0,108
	682	0,088	0,088	0,125	0,116
	687	0,100	0,105	0,123	0,154
	693	0,100	0,108	0,183	0,175
Thylacoïde	640	0,078	0,078	0,065	0,150
	648	0,060	0,043	0,073	0,110
	662	0,050	0,066	0,068	0,097
	668	0,066	0,066	0,075	0,100
	676	0,087	0,130	0,180	0,300
	682	0,120	0,092	0,100	0,150
	687	0,100	0,087	0,092	0,330
	693	0,399	0,199	1,600	0,130

En analysant à l'aide de composantes gaussiennes les spectres d'absorption et photoacoustique, nous voulions calculer les valeurs de désactivation thermique afin de déterminer les corrélations éventuelles avec les pigments et/ou les complexes. Il existe dans la littérature des analyses de composantes gaussiennes pour des spectres d'absorption (Tapie et al., 1982 et 1984) et des spectres de fluorescence (Ignatov et al., 1983 et Kramer and Amesz, 1982).

Lors de l'analyse de nos résultats, nous nous sommes rendus compte que l'ajustement des composantes gaussiennes pour la bande de Soret se fait plus difficilement que celui de la bande dans le rouge. C'est pour cette raison que le tableau 8 ne donne que les valeurs de la désactivation thermique des composantes gaussiennes pour la bande dans le rouge.

Tapie et al. (1982) ont trouvé que la comparaison entre le spectre expérimental et le spectre calculé à partir de la résultante des composantes gaussiennes est plus difficile pour l'ensemble du spectre que pour la région des bandes dans le rouge. Les auteurs expliquent cette difficulté par une perturbation des pigments absorbant au niveau de la bande de Soret. Cependant les auteurs n'expliquent pas la nature de la perturbation.

Au tableau 8, nous retrouvons les valeurs de désactivation thermique de la bande dans le rouge uniquement pour les composantes ayant une grande intensité d'absorption. Les composantes absorbant entre 640 et

676 nm sont attribuées au photosystème II tandis que les composantes situées entre 682 et 693 nm proviennent du photosystème I.

Nous avons vu au tableau 8 qu'en milieu anisotrope, pour la majorité des composantes, $DT_{\perp} > DT_{\parallel}$. Pour les spectres d'émission des mêmes échantillons en milieu anisotrope, les spectres pris en lumière polarisée parallèlement ont une plus grande intensité de fluorescence que ceux pris en lumière polarisée perpendiculairement. Donc les moments de transition des pigments orientés perpendiculairement dans la membrane des thylacoïdes favorisent comme mode de désactivation la perte de chaleur plutôt que de fluorescence.

La valeur de désactivation thermique reliée au photosystème I augmente lorsque nous étirons les films d'alcool de polyvinyle, et ceci de façon très marqué à 693 nm pour les thylacoïdes de la préparation 1 incorporés en milieu anisotrope (voir Tableau 8). Une des explications suggérées pourrait être le fait que le transfert d'énergie entre les deux photosystèmes serait perturbé. Mais les résultats de désactivation thermique permettent de conclure que les thylacoïdes de la préparation 1 présentent une grande désactivation thermique au niveau du photosystème I.

Les différences observées entre la désactivation thermique parallèle et la désactivation thermique perpendiculaire peuvent être reliées aux phénomènes suivants, premièrement, au changement d'interaction entre

les chromophores et leur environnement lors de l'étirement du film. Deuxièmement, aux interactions qui sont différentes dans le cas de moments de transition orientés parallèlement et perpendiculairement. Et troisièmement, au changement qui se produit dans le transfert d'énergie entre les molécules orientées parallèlement et perpendiculairement.

E) Durée de vie de fluorescence

La durée de vie de fluorescence des composantes photosynthétiques a été largement étudiée (Gulotty et al., 1985 et Haehnel et al., 1983 et Madge et al., 1982) au cours des dernières années, principalement en utilisant la spectroscopie en picoseconde afin de déterminer les composantes présentent à l'aide d'une analyse par déclin de fluorescence.

Des études ont démontré que la durée de vie de fluorescence pouvait varier en fonction de la température (Reisberg et al., 1982), de la longueur d'onde à l'émission (Wittmershaus et al., 1985) et de l'état physiologique des échantillons, par exemple à savoir si les centres réactionnels sont ouverts ou fermés (Madge et al., 1982). Le nombre de composante de durée de vie dépend du modèle sur lequel se base les auteurs. Ainsi nous pouvons avoir des modèles avec deux ou trois composantes (Butler, 1978), ou encore un modèle basé sur l'hétérogénéité du photosystème II (Berens et al., 1985). Peu importe le modèle sur lequel nous nous basons, la plupart des résultats expérimentaux en durée de vie de

fluorescence peuvent être résolus avec trois composantes exponentielles, même dans le cas où plus de composantes sont prévues (Gulotty et al., 1985). Mais il n'est pas toujours facile de faire les corrélations entre l'analyse des composantes de fluorescence et les complexes présents dans la membrane photosynthétique.

A la figure 29A, nous présentons la courbe de déclin ainsi que les valeurs de durée de vie de fluorescence pour les chloroplastes de la préparation 1 en milieu isotrope. La figure 29B présente une autre courbe de déclin, celle prise pour les thylacoïdes de la préparation 1 en milieu anisotrope. Nous pouvons voir que la courbe de déclin peut être ajustée avec deux ou trois exponentielles et que nous obtenons une bonne corrélation avec deux ou trois exponentielles. Pour déterminer le nombre d'exponentielle, nous nous servons de la valeur du χ^2 et nous regardons le résidu.

L'analyse des résultats de la figure 29A montre une valeur de durée de vie rapide ($0,417 \pm 0,112$ ns) et deux valeurs plus lentes ($3,395 \pm 0,389$ et $6,573 \pm 0,436$ ns). Selon Madge et al. (1982), la valeur de durée de vie la plus rapide qui apparaît lors de l'ajustement avec trois exponentielles serait attribuée au photosystème I tandis que les deux valeurs plus lentes seraient assignées au centre réactionnel du photosystème II. Dépendamment si le centre réactionnel est ouvert ou fermé, les valeurs de durée de vie varient (Dobek et al., 1985). Au sujet des échantillons étudiés dans la présente étude, des valeurs de durée de vie

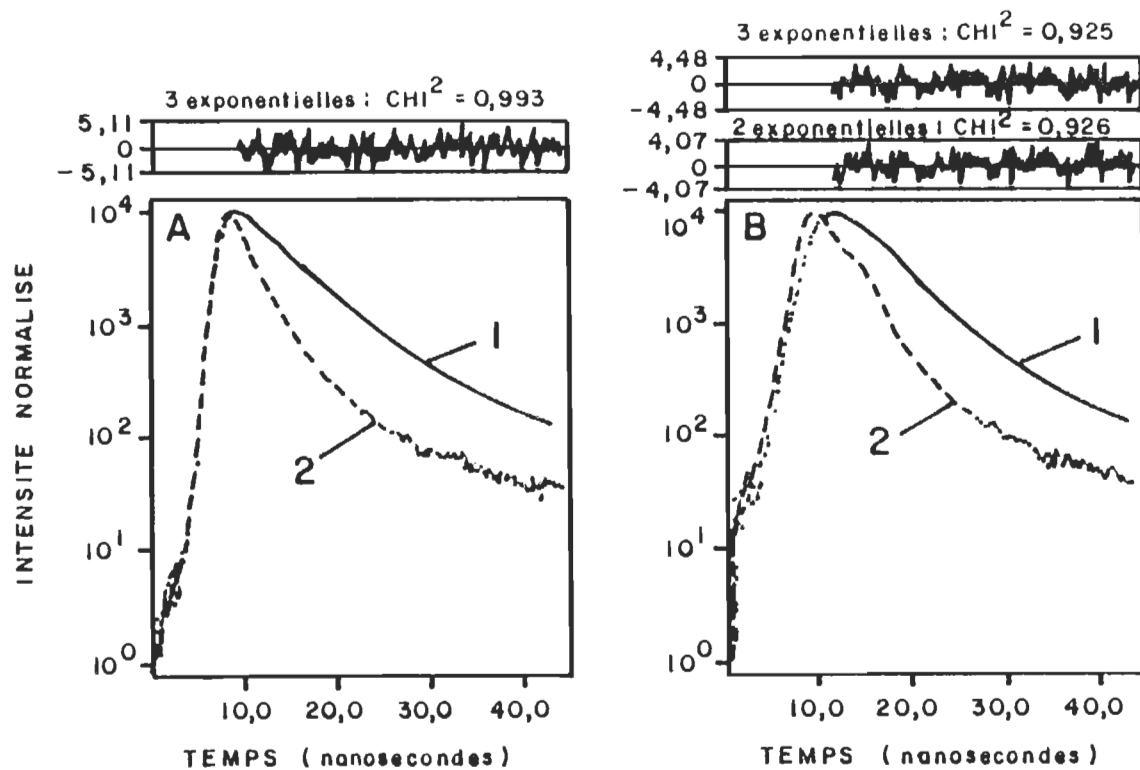


Figure 29. Courbe de déclin de fluorescence (1) de chloroplastes en milieu isotrope (A) et de thylacoides en milieu anisotrope (B). La courbe 2 représente le profil de la lampe. Au haut de la figure nous retrouvons le résidu de l'ajustement avec deux ou trois exponentielles.

supérieures à une nanoseconde permet de supposer que les centres réactionnels sont fermés.

Au tableau 9, nous présentons les valeurs de durée de vie moyenne obtenues par la méthode de modulation de phase et calculées à partir des mesures prises par le système PRA. Nous notons que les valeurs de durée de vie de fluorescence sont plus rapides pour les échantillons de la préparation 2 par rapport à celles de la préparation 1. Les valeurs de durée de vie moyenne obtenues par les deux méthodes sont comparables comme nous pouvons le voir pour les thylacoïdes de la préparation 1 incorporés en milieu isotrope. La durée de vie moyenne varie peu en fonction de la longueur d'onde à l'émission. Cependant les chloroplastes et les thylacoïdes de la préparation 2 donnent des valeurs de durée de vie moyenne supérieures pour une longueur d'onde à l'émission de 730 nm.

A partir de la méthode de modulation de phase, nous obtenons, en plus des valeurs de durée de vie moyenne, des valeurs de $m / \cos \psi$. Pour une valeur de $m / \cos \psi$ égale à un, le déclin de fluorescence serait mono-exponentiel alors que pour une valeur inférieure à un, le déclin serait pluri-exponentiel (Lakowicz and Balter, 1982). Les valeurs de $m / \cos \psi$ que nous avons trouvées pour nos échantillons, variaient entre 1,00 et 0,92. Mais la nature même de nos échantillons nous laisse supposer qu'il existe plusieurs composantes de fluorescence.

Tableau 9

Valeurs de la durée de vie moyenne prise à l'aide de la méthode de fluorescence par modulation de phase,
et calculée à partir des résultats obtenus à l'aide du fluorimètre PRA (*).

Échantillons et λ d'excitation (nm)	Polarisation de la lumière	Durée de vie (ns) à l'émission (nm)			Échantillons et λ d'excitation (nm)	Polarisation de la lumière	Durée de vie (ns) à l'émission (nm)		
		675	730	766			675	700	730
Chloroplastes entiers 0% - p2 (436)	" ⊥	0,39 0,44	0,48 0,57	0,68 0,70	Thylacoïdes 0% p2 (436)	" ⊥	0,78 0,76	-- --	0,93 0,85
Chloroplastes entiers 300% - p2 (436)	" ⊥	1,14 1,07	1,07 1,05	1,16 1,15	Thylacoïdes 300% p2 (436)	" ⊥	0,65 0,50	-- --	0,68 0,55
Chloroplastes brisés 0% - p2 (436)	" ⊥	0,92 0,88	0,99 0,93	0,99 0,96	Thylacoïdes 0% p1 (436)	" ⊥	3,41 3,40	2,83 2,91	3,23 3,10
Chloroplastes brisés 300% - p2 (436)	" ⊥	0,25 0,28	0,38 0,44	0,32 0,41	Thylacoïdes 0% p1 (420)	n* n*	3,26 3,53	3,19 3,42	-- --
Chloroplastes 0% p1 (420)	n*	3,64	2,69	--	Thylacoïdes 300% p1 (420)	n*	3,53	3,42	--
Chloroplastes 300% p1 (420)	n*	3,16	2,76	--					

Au tableau 9, nous présentons les valeurs de durée de vie moyenne obtenues par modulation de phase et calculées à l'aide des exponentielles obtenues à l'aide du fluorimètre PRA. Nous voyons que les valeurs de durée de vie moyenne sont différentes pour les chloroplastes et les thylacoïdes des deux préparations. Les valeurs des échantillons de la préparation 2 sont plus rapides que celles des échantillons de la préparation 1. Nous avons vu que les spectres de fluorescence des échantillons des deux préparations sont différents. Les spectres d'émission des chloroplastes et des thylacoïdes de la préparation 2 ont une bande principale de fluorescence dans la région du photosystème II, avec un épaulement dans la région du photosystème I, tandis que les spectres d'émission des chloroplastes et des thylacoïdes de la préparation 1 ont des bandes de fluorescence dans les régions des photosystèmes I et II.

Nous savons que le photosystème I possède une composante plus rapide que le photosystème II. Mais d'autres facteurs peuvent jouer sur les valeurs de durée de vie des chloroplastes et des thylacoïdes des préparations 1 et 2. Ainsi, lorsque les centres réactionnels sont ouverts, nous aurons des valeurs de durée de vie plus rapide que s'ils sont fermés (Dobek et al., 1985 et Madge et al., 1982).

Dans la littérature, nous retrouvons plusieurs valeurs de durée de vie qui sont attribuées à différents complexes. L'attribution et la durée de vie varient d'un auteur à l'autre, et la valeur exacte de durée

de vie dépend de plusieurs facteurs, en particulier la température, l'état physiologique, la longueur d'onde à l'émission et à l'excitation. Mais tout laisse à croire que la supposition que seulement deux ou trois composantes soient présentes, est une simplification (Berens et al., 1985). Pour pouvoir corréler adéquatement les durées de vie et les complexes responsables de la fluorescence, il faudrait faire des expériences additionnelles sur des systèmes simplifiés tel que des complexes isolés (Holzwarth et al., 1984), des mutants (Gulotty et al., 1985) ou de travailler sur des systèmes modèles avec des pigments ou avec des mélanges pigment-lipide ou pigment-protéine.

CHAPITRE V

CONCLUSION

Au cours de ce travail, nous avons étudié les propriétés spectroscopiques (absorption, excitation, émission et photoacoustique) de chloroplastes et de thylacoïdes orientés. Pour nos expériences, nous utilisons la méthode d'orientation uniaxiale en plaçant nos échantillons autour d'un axe se situant dans le plan d'observation, soit le plan du film d'alcool de polyvinyle. L'orientation obtenue diffère de celle de d'autres auteurs, utilisant principalement la méthode de gel pressé. Dans le cas de cette méthode, les membranes sont entassées les unes sur les autres ce qui implique que les moments de transition des composantes de fluorescence se situent soit dans le plan pour la fluorescence polarisée parallèlement ou hors du plan pour la fluorescence polarisée perpendiculairement. Dans le cas de notre méthode les deux composantes de fluorescence se situent dans le plan d'observation.

Nous notons une stabilisation des chloroplastes et des thylacoïdes lorsqu'ils sont incorporés dans les films d'alcool de polyvinyle. En étirant ces films pour former le milieu anisotrope, nous causons une déformation des chloroplastes et des thylacoïdes. Comme nous pouvons le voir sur les photographies d'échantillons, le dichroïsme linéaire

observé est dû en partie à cette déformation des chloroplastes et des thylacoïdes.

A partir des spectres polarisés des chloroplastes et des thylacoïdes incorporés dans les films d'alcool de polyvinyle isotrope, nous observons que, dû à l'orientation des molécules dans la membrane, nous pouvons, en nous servant de la méthode de photosélection, étudier le transfert d'énergie entre les pigments ayant des moments de transition orientés différemment.

En spectroscopie d'émission polarisée, nous avons noté qu'une matrice solide, comme les films d'alcool de polyvinyle, peut dans certaines conditions de préparation, permettre l'observation de l'émission de fluorescence du photosystème I, comme si les spectres étaient pris à basse température.

De plus, à partir des spectres d'émission polarisée des échantillons, nous observons une réorientation partielle des molécules due à la déformation des chloroplastes et des thylacoïdes, ce qui cause une perturbation dans le processus du transfert d'énergie d'excitation. Le phénomène est très marqué dans le cas des thylacoïdes de la préparation 1. Et des changements dans le transfert d'énergie influence aussi la désactivation thermique des différents complexes puisque les processus d'émission de fluorescence, de désactivation thermique et de transfert d'énergie compétitionnent entre eux.

Les calculs de désactivation thermique montrent que les pigments tels la chlorophylle-b et les caroténoïdes possédant une faible intensité de fluorescence ont une désactivation thermique plus grande que les pigments fluorescents fortement. De plus la désactivation thermique des photosystèmes varie entre les photosystèmes I et II.

Les différences entre la désactivation thermique parallèle et perpendiculaire proviennent d'un ensemble de phénomènes complexes incluant la superposition des interactions chromophore-protéine et chromophore-chromophore qui ressemblent aux interactions pigment-alcool de polyvinyle et pigment-pigment que nous retrouvons lors de l'utilisation d'un système modèle, par exemple la mérocyanine-540.

Dans ce travail, nous montrons qu'en employant la spectroscopie polarisée et en utilisant des méthodes complémentaires telles que l'absorption, l'excitation, l'émission, la photoacoustique et la mesure de durée de vie de fluorescence, nous pouvons caractériser les phénomènes spectroscopiques propres à l'orientation des pigments.

RÉFÉRENCES

- Arntzen, C.J. and Briantais, J.M. Chloroplasts structure and function.
In Govindjee (Ed.), *Bioenergetics of photosynthesis* . Academic
Press, New York, 1975, 51-113.
- Bauman, D. and Wrobel, D. Dichroism and polarized fluorescence of chlorophyll-a, chlorophyll-c and bacteriochlorophyll-a dissolved in liquid crystals. *Biophys. Chem.*, 1980, 12, 83-91.
- Bell, A.G. Upon the production of sound by radiant energy. *Philos. Magazine*, 1881, 11, 510-528.
- Benziger, J.B., Mc Govern, S.J. and Royce, B.S.H. IR photoacoustic spectroscopy of silica and aluminum oxyde. In Deviney, M.L. and Gland, J.L. (Eds.) *Catalyst Characterization Science* . American Chemical Society, 1985, 449-463.
- Berens, S.J., Scheele, J., Butler, W.L. and Magde, D. Time-resolved fluorescence studies of spinach chloroplasts evidence for the heterogeneous bipartite model. *Photochem. Photobiol.*, 1985, 42, 51-57.

- Biggins, J. and Svejksky, J. Linear dichroism of microalgae, developing thylakoids and isolated pigment-protein complexes in stretched poly(vinyl alcohol) films at 77K. *Biochim. Biophys. Acta*, 1980, 592, 565-576.
- Bolt, J. and Sauer, K. Linear dichroism of light harvesting bacteriochlorophyll proteins from *Rhodospseudomonas sphaeroides* in stretched polyvinyl alcohol films. *Biochim. Biophys. Acta*, 1979, 546, 54-63.
- Bose, S. Chlorophyll fluorescence in green plants and energy transfer pathways in photosynthesis. *Photochem. Photobiol.*, 1982, 36, 725-731.
- Breton, J. The state of chlorophyll and carotenoid *in vivo*. II-A linear dichroism study of pigment orientation in photosynthetic bacteria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1974, 59, 1011-1017.
- Breton, J. and Paillotin, G. Dichroism of transient absorbance changes in the red spectral region using oriented chloroplasts I. Field indicating absorbance changes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1977, 459, 58-65.
- Breton, J. and Roux, E. Chlorophylls and carotenoids states *in vivo* I-A linear dichroism study of pigments orientation in spinach chloroplasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1971, 45, 557-563.

- Breton, J. and Vermeglio, A. Orientation of photosynthetic pigments *in vivo*. In Govindjee (Ed.), *Photosynthesis: Energy conversion by plants and bacteria* (vol. 1). Academic Press, New York, 1982, 153-194.
- Breton, J., Michel-Villaz, M. and Paillotin, G. Orientation of pigments and structural proteins in the photosynthetic membrane of spinach chloroplasts: A linear dichroism study. *Biochim. Biophys. Acta*, 1973, 314, 42-56.
- Burke, J.J., Ditto, C.L. and Arntzen, C.J. Involvement of the light-harvesting complex in cation regulation of excitation energy distribution in chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1978, 187, 252-263.
- Buschmann, C., Prehn, H. and Lichtenthaler, H. Photoacoustic spectroscopy (PAS) and its application in photosynthesis research. *Photosyn. Res.*, 1984, 5, 29-46.
- Butler, W.L. Energy distribution in the photochemical apparatus of photosynthesis. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 1978, 29, 345-378.
- Carpentier, R., LaRue, B. and Leblanc, R.M. Photoacoustic spectroscopy of *Anacystis nidulans*. I. Effect of sample thickness on photoacoustic signal. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1983, 222, 403-410.

- Dobek, A., Deprez, J., Geacintov, N.E., Paillotin, G. and Breton, J. Chlorophyll fluorescence phenomena in chloroplasts on subnanosecond time-scales probed by picosecond pulse pairs. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 806, 81-92.
- Douce, R. and Joyard, J. The regulation of the plastid envelope during development. In Baker, N.R. and Barber, J. (Eds.). *Chloroplast Biogenesis*. Elsevier, Amsterdam, 1984, 71-132.
- Drapier, D. et Dubacq, J.P. Quelques aspects de l'organisation des complexes pigments-protéines des membranes chloroplastiques. *Ann. Biol.*, 1984, XXIII, 321-337.
- Ducharme, D., Tessier, A. and Leblanc, R.M. Design and characteristics of a cell for photoacoustic spectroscopy of condensed matter. *Rev. Sci. Instrum.*, 1979, 50, 1461-1462.
- Frackowiak, D., Balter, A., Szurkowski, J., Lorrain, L., Szych, B. and Hotchandani, S. Deactivation of electronically excited Merocyanine 540 located in anisotropic polyvinyl alcohol films. *J. Lumin.*, 1986c, (soumis).
- Frackowiak, D., Erokhina, L.G., Balter, A., Lorrain, L., Szurkowski, J. and Szych, B. Polarized absorption, fluorescence and photoacoustic spectra of phycobilisomes embedded in polyvinyl alcohol films. *Biochim. Biophys. Acta*, 1986a, 851, 173-180.

- Frackowiak, D., Hotchandani, S., Fiksinski, K. and Leblanc, R.M. Photoacoustic spectra of biliproteins in polyvinyl alcohol films. *Photosynt.*, 1983a, 17, 456-459.
- Frackowiak, D., Hotchandani, S. and Leblanc, R.M. Effect of electric field on polarized absorption spectra of chlorophyll-a and b in nematic liquid crystal. *Photobiochem. Photobiophys.*, 1983b, 6, 339-350.
- Frackowiak, D., Hotchandani, S., Szych, B. and Leblanc, R.M. Polarized photoacoustic spectroscopy of oriented system. *Acta Phys. Polon.*, 1986b, A69, 121-133.
- Frackowiak, D., Lorrain, L., Wrobel, D. and Leblanc, R.M. Polarized photoacoustic, absorption and fluorescence spectra of chloroplasts and thylakoids oriented in polyvinyl alcohol films. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1985, 126, 254-261.
- French, C.S. The distribution and action in photosynthesis of several forms of chlorophyll. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1971, 68, 2893-2897.
- Gagliano, A.G., Geacintov, N.E., Breton, J., Acker, S. and Remy, R. Electric linear dichroism of P700 chlorophyll-a protein complexes. *Photochem. Photobiol.*, 1979, 29, 415-418.

- Ganago, A., Garab, Gy.I. and Faludi-Daniel, A. Analysis of linearly polarized fluorescence of chloroplasts oriented in polyacrylamide gel. *Biochim . Biophys. Acta*, 1983, 723, 287-293.
- Geacintov, N.E., Van Nostrand, F. and Becker, J.F. Polarized light spectroscopy of photosynthetic membranes in magneto-oriented whole-cells and chloroplasts. Fluorescence and dichroism. *Biochim . Biophys. Acta*, 1974, 347, 443-463.
- Govindjee and Govindjee, R. Introduction to photosynthesis. In Govindjee (Ed.), *Bioenergetics of photosynthesis*. Academic Press, New York, 1975, 1-50.
- Gulotty, R.J., Mets, L., Alberte, R.S. and Fleming, G.R. Picosecond fluorescence study of photosynthetic mutant of *Chlamydomonas reinhardtii* origin of the fluorescence decays kinetics of chloroplasts. *Photochem . Photobiol.*, 1985, 41, 487-496.
- Haehnel, W., Holzwarth, A.R. and Wendler, J. Picosecond fluorescence kinetics and energy transfer in antenna chlorophylls of green algae. *Photochem . Photobiol.*, 1983, 37, 435-443.
- Hoff, A.J. The orientation of chlorophyll and bacteriochlorophyll molecules in an oriented lecithin multilayer. *Photochem . Photobiol.*, 1974, 19, 51-57.

- Holzwarth, A.R., Haehnel, W., Wendler, J., Suter, G. and Ratajczak, R. Picosecond fluorescence kinetics and energy transfer in antenna chlorophylls of green algae and membrane fractions of thylakoids. In Sybesma, C. (Ed.), *Advances in photosynthesis research* (vol. 1). M. Nijoff and Dr W. Junk Publishers, The Hague, 1984, 73-76.
- Ignatov, N.V., Krasnovskii, A.A., Litvin, F.F., Belyaeva, O.B. and Walter, G. Low-temperature (77K) excitation spectra of fluorescence and phosphorescence of native forms of protochlorophyll (ide) in etiolated leaves of *Phaseolus vulgaris* and *P. coccineus*. *Photosynth.*, 1983, 17, 352-360.
- Ikari, T., Shigetomi, S., Koga, Y. and Shigetomi, S. Low temperature photoacoustic spectra of n-InSe. *J. Phys. C.: Solid State Phys.*, 1984, 17, L969-L972.
- Jeanfils, J., Coquempot, M.F. and Thomas, D. Study of fluorescence kinetics and of photosystem II activity in fixed or immobilized chloroplasts membranes. *Enzyme Microb. Technol.*, 1986, 8, 157-160.
- Kanstad, S.O., Cahen, D. and Malkin, S. Simultaneous detection of photosynthetic energy storage and oxygen evolution in leaves by photo-thermal radiometry and photoacoustics. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 722, 182-189.

- Kramer, H. and Ames, J. Anisotropy of the emission and absorption bands of spinach chloroplasts measured by fluorescence polarization and polarized excitation spectra at low temperature. *Biochim. Biophys. Acta* , 1982, 682, 201-207.
- Lakowicz, J.R. and Balter, A. Analysis of excited-state process by phase-modulation fluorescence spectroscopy. *Biophys. Chem.*, 1982, 16, 117-132.
- Lehninger, A.L. *Biochemistry* (2nd ed.). Worth Publishers Inc., New York, 1975.
- Litvin, F.F. and Sineshchekov, V.A. Molecular organization of chlorophyll and energetics of the initial stages in photosynthesis. In Govindjee (Ed.), *Bioenergetics of photosynthesis*. Academic Press, New York, 1975, 619-661.
- Madge, D., Berens, S.J. and Butler, W.L. Picosecond fluorescence in spinach chloroplasts. *S.P.I.E.* , 1982, 322, 80-86.
- Michel-Villaz, M. Fluorescence polarization: Pigment orientation and energy transfer in photosynthetic membranes. *J. theor. Biol.* , 1976, 58, 113-129.

Morita, S. and Miyazaki, T. Dichroism of bacteriochlorophyll in cells of the photosynthetic bacteria *Rhodospseudomonas palustris*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1971, 245, 151-159.

Nabedryk, E., Andrianambinintsoa, S. and Breton, J. Transmembrane orientation of α -helices in the thylakoid membrane and in the light-harvesting complexe. A polarized infra-red spectroscopy study. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, 765, 380-387.

Nobel, P.S. *Biophysical plant physiology and ecology* (3d ed). Freeman and Company, San Francisco, 1983.

Norden, B. Applications of linear dichroism spectroscopy. *Applied Spect. Rev.*, 1978, 14, 157-248.

Paillotin, G. and Breton, J. Orientation of chlorophyll within chloroplasts as shown by optical and electrochromic properties of the photosynthetic membrane. *Biophys. J.*, 1977, 18, 63-79.

Paillotin, G., Vermeglio, A. and Breton, J. Orientation of reaction center and antenna chromophores in the photosynthetic membrane of *Rhodospseudomonas viridis*. *Biochim. . Biophys. Acta* , 1979, 545, 249-264.

- Papageorgious, G. Chlorophyll fluorescence: An intrinsic probe of photosynthesis. In Govindjee (Ed.), *Bioenergetics of photosynthesis*. Academic Press, New York, 1975, 319-375.
- Parker, J.G. Optical absorption in glass: Investigation using an acoustic technique. *Appl. Opt.*, 1973, 12, 2974-2977.
- Penna, F.J., Reed, D.W. and Ke, B. The orientation of photosynthetic pigments in chromatophore membranes and in purified reaction centers of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. In Avron, M. (Ed.). *Proceeding of the Third international congress on photosynthesis* (vol. 1). Elsevier, Amsterdam, 1975, 421-425.
- Petke, J.D., Maggiora, G.M., Shipman, L. and Christoffersen, R.E. Stereoelectronic properties of photosynthetic and related systems-V *Ab initio* configuration interaction calculation on the ground and lower excited singlet and triplet states of ethyl chlorophyllide-a and ethyl pheophorbide-a. *Photochem. Photobiol.*, 1979, 30, 203-223.
- Poulet, P., Cahen, D. and Malkin, S. Photoacoustic detection of photosynthetic oxygen evolution from leaves. Quantitative analysis by phase and amplitude measurements. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 724, 433-446.

- Rafferty, C.N. and Clayton, R.K. Properties of reaction center of *Rhodopseudomonas sphaeroides* in dried gelatin films. Linear dichroism and low temperature spectra. *Biochim. Biophys. Acta* , 1978, 502, 51-60.
- Reeves, S.G. and Hall, D.O. Higher plant chloroplasts and grana: General preparative procedures (excluding high carbon dioxide fixation ability chloroplasts). In A. San Pietro (Ed.) *Methods in enzymology* (vol. 69), Academic Press, New York, 1980, 85-94.
- Reisberg, P., Nairn, J.A. and Sauer, K. Picosecond fluorescence kinetics in spinach chloroplasts at low temperature. *Photochem. Photobiol.*, 1982, 36, 657-661.
- Rosencwaig, A. Photoacoustic spectroscopy of solids. *Opt. Commun.* , 1973, 7, 305-308.
- Rosencwaig, A. Photoacoustic spectroscopy. In Marton (Ed.) *Advances in electronics and electron physics* (vol. 46). Academic Press, New York, 1978, 207-310.
- Rosencwaig, A. and Gersho, A. Photoacoustic effect with solids: A theoretical treatment. *Science* , 1975, 190, 556-557.

Saito, K., Williams, W.P., Allen, J.F. and Bennett, J. Comparaison of ATP-induced and State 1/State 2 related changes in excitation energy distribution in *Chlorella vulgaris*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 724, 94-103.

Salisbury, F.B. and Ross, C.W. *Plant Physiology* (2nd ed.). Wadsworth Publishing Company Inc., Belmont, 1978.

Satoh, K. and Butler, W.L. Competition between the 735 nm fluorescence and the photochemistry of photosystem 1 in chloroplasts at low temperature. *Biochim. Biophys. Acta*, 1978, 502, 103-110.

Satoh, K. and Fork, D. A new mechanism for adaptation to change in light intensity and quality in the red alga *Porphyra perforata*. I. Relation to State 1/State 2 transitions. *Biochim. Biophys. Acta*, 1983, 722, 190-196.

Sauer, K. Primary events and the trapping of energy. In Govindjee (Ed.), *Bioenergetics of photosynthesis*. Academic Press, New York, 1975, 115-181.

Szito, T., Zimanyi, L. and Faludi-Daniel, A. Fluorescence polarization spectra of granal and stromal membranes treated with linolenic acid. Orientation of the photosystem I core complex within the membrane. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 808, 428-436.

- Tapie, P., Choquet, Y., Breton, J., Delepelaire, P. and Wollman, F.A. Orientation of photosystem I pigments. Investigation by low-temperature linear dichroism and polarized fluorescence emission. *Biochim. Biophys. Acta*, 1984, 767, 57-69.
- Tapie, P., Haworth, P., Hervé, G. and Breton, J. Orientation of the pigments in the thylakoids membrane and in the isolated chlorophyll-protein complexes of higher plants. III. A quantitative comparison of the low-temperature linear dichroism spectra of thylakoids and isolated pigment-protein complexes. *Biochim. Biophys. Acta*, 1982, 682, 339-344.
- Thomasset, B., Barbotin, J.N., Thomas, D., Thomasset, T., Vejux, A. and Jeanfils, J. Fluorescence and photoacoustic spectroscopy of immobilized thylakoids. *Biotechn. Bioengin.*, 1983, XXV, 2453-2468.
- Upadhyaya, V., Tiwari, L.B. and Mishra, S.P. A study of the fluorescence of chlorophyll by photoacoustic spectrometry. *Spectrochim. Acta*, 1985, 41A, 833-836.
- Vacek, K., Wong, D. and Govindjee Absorption and fluorescence properties of highly enriched reaction center particles of photosystem I and of artificial system. *Photochem. Photobiol.*, 1977, 26, 269-276.

Weiss, E. Light- and temperature- induced changes in the distribution of excitation energy between photosystem I and photosystem II in spinach leaves. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985a, 807, 118-126.

Weiss, E. Chlorophyll fluorescence at 77K in intact leaves: Characterization of a technique to eliminate artifacts related to self-absorption. *Photosynth. Res.*, 1985b, 6, 73-86.

Wittmershaus, B., Nordlund, T.M., Knox, W.H., Knox, R.S., Geacintov, N.E. and Breton, J. Picosecond studies at 77K of energy transfer in chloroplasts at low and high excitation intensities. *Biochim. Biophys. Acta*, 1985, 806, 93-106.